



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

**ESTUDO DO EFEITO DO PALBOCICLIB E DO TIPIFARNIB
EM LINHAS CELULARES DE CARCINOMAS
ANAPLÁSICOS DA TIRÓIDE**

SARA PATRÍCIA LOPES VENTURA

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

(OUTUBRO, 2016)



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Estudo do efeito do Palbociclib e do Tipifarnib em linhas
celulares de carcinomas anaplásicos da tiróide

Autor: Sara Patrícia Lopes Ventura

Orientador: Doutora Branca Cavaco

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas

A presente dissertação foi escrita ao abrigo do antigo acordo ortográfico.

Agradecimentos

Em conclusão deste trabalho quero, antes de mais, agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram e permitiram a sua concretização. Um agradecimento especial à minha orientadora, Doutora Branca Cavaco, por me ter aceite no grupo de Endocrinologia Molecular do IPO-Lisboa e por me ter dado a oportunidade de desenvolver este projecto. Pelos seus ensinamentos, confiança e incentivo que permitiram desenvolver melhor as minhas competências na ciência. Ao Doutor Valeriano Leite pela sua curiosidade, disponibilidade e interesse no desenrolar do projecto.

Agradeço à Mestre Ana Matias, por todos os ensinamentos, pelo conhecimento transmitido, pela excelente integração e pela boa disposição.

Quero agradecer também aos meus colegas de grupo, Doutoradas Margarida Moura e Ana Luísa Silva pela ajuda que disponibilizaram sempre ao longo deste ano. À Doutoranda Inês Marques pela sua preocupação constante em ajudar e acima de tudo, à minha colega de Mestrado Inês Gomes, por estar presente nos momentos mais difíceis e por compreender todas as dificuldades. Quero agradecer também às Doutoradas Ana Pinto e Joana Pereira pelo seu acompanhamento e um especial agradecimento à Doutora Marta Pojo pelo seu apoio incansável e às novas ideias que conseguiu implementar.

Agradeço ainda à Sofia Nunes, Sofia Gouveia e Filipa Coelho por estarem sempre disponíveis para ajudar e aos restantes elementos da UIPM, agradeço a convivência e boa disposição vivida diariamente.

A todos os amigos que permitiram de alguma forma descomplicar os momentos difíceis e criar momentos de diversão ao longo do ano, aos colegas de trabalho pela boa disposição e alegria vivida diariamente e ao meu chefe por toda a compreensão. Aos elementos essenciais da minha vida, pelo apoio constante, incentivo, força, compreensão e acima de tudo paciência nos momentos mais difíceis e que contribuíram para tornar os obstáculos fáceis de ultrapassar.

Por último, mas não menos importante, um agradecimento especial ao meu irmão e ao meu pai por todo o apoio incondicional durante todo o meu percurso académico e à melhor mãe do mundo pelo apoio, carinho, incentivo, paciência e compreensão. Sem eles nada disto seria possível.

A todos, um enorme obrigado.

Resumo

O cancro da tiróide é a neoplasia mais comum do sistema endócrino. Os carcinomas da tiróide que derivam das células foliculares englobam os carcinomas bem-diferenciados (WDTC), os carcinomas pouco diferenciados (PDTC) e os carcinomas indiferenciados ou anaplásicos (ATC). Os WDTC subdividem-se em carcinomas papilares (PTC) e foliculares (FTC). Os ATC representam 2-3 % dos carcinomas da tiróide, sendo considerados os tumores mais agressivos da tiróide, para os quais não existem actualmente terapêuticas eficazes. O nosso grupo identificou, em estudos anteriores, os genes *TP53*, *RAS*, *CDKN2A* (p14^{ARF}/p16^{INK4A}) e *CDKN2B* e (p15^{INK4B}) e vias relacionadas, como desempenhando papéis essenciais no desenvolvimento de ATC.

As proteínas p15^{INK4B} e p16^{INK4A} funcionam como supressores tumorais inibindo as CDK4/6 e levando à paragem do ciclo celular. O Palbociclib inibe as CDK4/6, sendo esperado que a sua acção compense a perda funcional dos genes *CDKN2A* e *CDKN2B*. Por outro lado, mutações no gene *HRAS* conduzem à activação constitutiva da via MAPK-ERK e, consequentemente, ao desenvolvimento tumoral. A isoforma *HRAS* tem de ser farnesilada para adquirir actividade oncogénica, representando um alvo molecular do composto Tipifarnib, um inibidor da farnesil transferase (FTI).

O objectivo principal deste projecto foi identificar novas terapêuticas direccionadas para alvos moleculares específicos envolvidos no desenvolvimento de ATC, tendo sido estudados dois novos compostos, o Palbociclib e o Tipifarnib.

Para estudo do seu efeito nas diferentes linhas celulares foram realizados ensaios de viabilidade metabólica celular (pelo método MTS), ensaios de ciclo e morte celular (por citometria de fluxo) e viabilidade celular (pelo método de exclusão com azul de tripano). Foram usadas três linhas celulares de ATC: C643 (mutações nos genes *TP53*, *HRAS* e deleção dos genes *CDKN2A* e *CDKN2B*), T238 (mutações nos genes *TP53*, *CDKN2A*, *BRAF* e *PIK3CA*) e T235 (mutação no gene *BRAF*); uma linha celular de PTC designada BCPAP (mutações nos genes *BRAF* e *TP53*); e células normais de tiróide PCCL3.

Nos ensaios de ciclo celular e de viabilidade celular realizados com o Palbociclib observou-se, respectivamente, um aumento significativo de células na fase G0/G1 do ciclo celular e uma diminuição do número de células viáveis ao longo do tempo, nas linhas celulares de ATC e PTC, mas não nas células normais de tiróide.

Nos ensaios realizados com o Tipifarnib observou-se um efeito do composto apenas na linha celular de ATC, com mutação no gene *HRAS*, que consistiu no aumento significativo de células na fase G2/M e na diminuição do número de células viáveis ao longo do tempo. Os resultados preliminares do Tipifarnib quanto à expressão do mRNA de genes envolvidos na regulação do ciclo celular sugeriram, em concordância com os resultados dos ensaios de ciclo celular, que este composto levou à paragem do ciclo na transição G2/M, pelo aumento observado na expressão dos genes *CCNA2*, *CDK2* e *CDC2*.

Os resultados deste estudo sugerem que o Palbociclib e o Tipifarnib poderão ter um papel importante na inibição da progressão tumoral. A continuação deste trabalho poderá contribuir para clarificar quais os mecanismos de acção e a relevância destes compostos como terapêuticas para os ATC.

Palavras-chave: carcinoma anaplásico da tiróide (ATC), alvos moleculares, Palbociclib, Tipifarnib, linhas celulares.

Abstract

Thyroid cancer is the most common malignancy of the endocrine system. Thyroid carcinomas, which derive from follicular cells include well-differentiated carcinomas (WDTC), poorly differentiated carcinomas (PDTC) and undifferentiated or anaplastic carcinomas (ATC). The WDTC are subdivided into papillary carcinomas (PTC) and follicular carcinomas (FTC). ATC represent 2-3% of thyroid carcinomas, being considered the most aggressive thyroid tumours, for which there are currently no effective therapies. In previous studies, our group identified the genes *TP53*, *RAS*, *CDKN2A* (p14^{ARF}/p16^{INK4A}), *CDKN2B*, (p15^{INK4B}) and related pathways as playing essential roles in the development of ATC.

The p15^{INK4B} and p16^{INK4A} proteins act as tumour suppressors by inhibiting CDK4/6 and leading to cell cycle arrest. Palbociclib inhibits CDK4/6, so it is expected that its action compensates the functional loss of *CDKN2A* and *CDKN2B* genes. On the other hand, *HRAS* gene mutations lead to constitutive activation of the MAPK-ERK pathway, and thus to tumour development. The *HRAS* isoform have to be farnesylated to acquire oncogenic activity, representing a molecular target for Tipifarnib compound, a farnesyl transferase inhibitor (FTI).

The main objective of this project was to identify novel therapies directed at specific molecular targets involved in the development of ATC. In particular, we aimed to study the effect of two compounds, Palbociclib and Tipifarnib, in ATC cell lines.

Metabolic cell viability (MTS assay), cell cycle and death (flow cytometry) and cell viability (trypan blue exclusion method) were assessed to study the effect of these compounds on the different cell lines. Three ATC cell lines were used: C643 (with *TP53* and *HRAS* gene mutations and deletion of *CDKN2A* and *CDKN2B* genes), T238 (with *TP53*, *CDKN2A*, *BRAF* and *PIK3CA* gene mutations) and T235 (with *BRAF* gene mutation); one PTC cell line designated BCPAP (with *BRAF* and *TP53* gene mutations); and normal thyroid cells (PCCL3 cells).

In the cell cycle and viability assays performed with Palbociclib, a significant cell arrest in the G0/G1 phase and a decreased number of viable cells through time, were observed in ATC and PTC cell lines. These effects were not observed in normal thyroid cells.

In the study of Tipifarnib, significant effects were only observed in the ATC cell line with an *HRAS* mutation, which consisted in an arrest in the G2/M phase of cell cycle, and in a decrease in the number of viable cells through time. Preliminary results of the study of Tipifarnib effect in mRNA expression of genes involved in cell cycle regulation (*CCNA2*, *CDK2* and *CDC2* genes), were in agreement with the results obtained in the cell cycle assays, suggesting that this compound led to cycle arrest in the G2/M transition.

The results of this study suggest that Palbociclib and Tipifarnib may play a major role in inhibiting tumour progression. The continuation of this work may help to clarify the mechanisms of action and the relevance of these compounds as therapies for ATC.

Key words: anaplastic thyroid carcinoma (ATC), molecular targets, Palbociclib, Tipifarnib, cell lines.

Índice

| | |
|---|----------|
| Agradecimentos | i |
| Resumo | iii |
| <i>Abstract</i> | v |
| Índice | vii |
| Índice de figuras..... | x |
| Índice de tabelas..... | xiii |
| Lista de nomenclaturas, abreviaturas e símbolos..... | xv |
| | |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1. A biologia do cancro | 1 |
| 1.2. A glândula tiroideia..... | 3 |
| 1.3. Neoplasias da tiróide | 4 |
| 1.4. Neoplasias derivadas do epitélio folicular da tiróide (NMTC)..... | 5 |
| 1.4.1. Carcinomas bem diferenciados da tiróide (WDTC)..... | 5 |
| 1.4.2. Carcinomas pouco diferenciados da tiróide (PDTC) | 6 |
| 1.4.3. Carcinomas indiferenciados ou anaplásicos da tiróide (ATC)..... | 7 |
| 1.5. Perfis de expressão génica globais de tumores da tiróide | 8 |
| 1.5.1. Perfis de expressão génica em PDTC e ATC..... | 8 |
| 1.6. Alterações moleculares envolvidas na progressão e desdiferenciação dos carcinomas da tiróide | 9 |
| 1.7. Novos alvos moleculares e abordagens terapêuticas para formas agressivas de cancro da tiróide | 12 |
| 1.7.1. Processos celulares: ciclo celular e proliferação celular | 12 |
| 1.7.2. Alvos moleculares p53/p14 ^{ARF} – compostos PRIMA- ^{1MET} e Nutlin-3 | 14 |
| 1.7.3. Alvos moleculares p14 ^{INK4B} e p16 ^{INK4A} – composto Palbociclib..... | 17 |
| 1.7.4. Alvo molecular <i>HRAS</i> – composto Tipifarnib | 19 |

| | |
|--|-----------|
| 2. Objectivos..... | 23 |
| 3. Materiais e métodos | 25 |
| 3.1. Cultura de células | 25 |
| 3.1.1. Descongelação das células | 26 |
| 3.1.2. Criopreservação das células | 26 |
| 3.1.3. Propagação e expansão das células | 27 |
| 3.2. Compostos testados | 28 |
| 3.2.1. Preparação das soluções <i>stock</i> | 28 |
| 3.2.2. Diluições seriadas dos compostos | 28 |
| 3.3. Estudo da viabilidade metabólica celular por ensaios de MTS..... | 29 |
| 3.4. Estudo do ciclo celular por citometria de fluxo | 31 |
| 3.5. Estudo da morte celular por citometria de fluxo | 33 |
| 3.6. Estudo da viabilidade celular por contagem directa em hemocitómetro | 35 |
| 3.7. Extracção de RNA..... | 35 |
| 3.8. Quantificação do RNA por espectrofotometria..... | 36 |
| 3.9. Síntese de cDNA por transcrição reversa de RNA | 37 |
| 3.10. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)..... | 38 |
| 3.10.1. Desenho de <i>primers</i> para qRT-PCR..... | 39 |
| 3.10.2. Curvas de eficiência e curvas de <i>melting</i> | 40 |
| 3.10.3. Análise de dados do qRT-PCR – Quantificação relativa | 40 |
| 3.10.4. Análise da expressão de alvos moleculares por qRT-PCR | 41 |
| 3.11. Análise estatística | 42 |
| 4. Resultados | 43 |
| 4.1. Estudo do efeito do Palbociclib em células normais da tiróide e em linhas celulares de carcinomas da tiróide | 43 |
| 4.1.1. Determinação do IC50 do Palbociclib em linhas celulares de ATC ... | 43 |
| 4.1.2. Estudo do efeito do Palbociclib no ciclo, morte e viabilidade celular em linhas de ATC..... | 45 |
| 4.1.3. Estudo do efeito do Palbociclib na viabilidade celular numa linha celular de PTC..... | 54 |
| 4.1.4. Estudo do efeito do Palbociclib na viabilidade celular em células normais de tiróide..... | 55 |

| | |
|---|------------|
| 4.2. Estudo do efeito do Tipifarnib em linhas celulares de carcinomas anaplásicos da tiróide..... | 56 |
| 4.2.1. Determinação do IC50 do Tipifarnib em linhas celulares de ATC..... | 56 |
| 4.2.2. Estudo do efeito do Tipifarnib no ciclo, morte e viabilidade celular em linhas de ATC..... | 58 |
| 4.3. Análise da expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular..... | 67 |
| 5. Discussão | 69 |
| 5.1. Estudo do Palbociclib..... | 70 |
| 5.2. Estudo do Tipifarnib..... | 76 |
| 6. Conclusões e perspectivas | 85 |
| 7. Referências bibliográficas..... | 87 |
| 8. Anexo I | 93 |
| 8.1. Materiais e métodos suplementares..... | 93 |
| 8.1.1. Cultura de células | 93 |
| 8.1.2. Descongelação das células | 93 |
| 8.1.3. Criopreservação das células | 94 |
| 8.1.4. Propagação e expansão das células | 94 |
| 8.2. Compostos testados | 94 |
| 8.3. Ensaio de viabilidade metabólica celular | 95 |
| 8.4. Estudo do ciclo celular por citometria de fluxo | 96 |
| 8.5. Estudo da morte celular por citometria de fluxo | 97 |
| 8.6. Estudo da viabilidade celular por contagem directa em hemocitómetro | 98 |
| 8.7. Extracção de RNA..... | 99 |
| 8.8. Quantificação de RNA por espectrofotometria..... | 100 |
| 8.9. Síntese de cDNA por transcrição reversa de RNA | 100 |
| 8.10. PCR quantitativo em tempo-real (qRT-PCR) | 100 |
| 9. Anexo II..... | 103 |
| 10. Referências bibliográficas suplementares | 105 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Diagrama esquemático das novas capacidades necessárias para a progressão tumoral | 2 |
| Figura 2 – Posição anatómica da glândula tiroideia | 3 |
| Figura 3 – Esquema representativo da progressão dos carcinomas da tiróide..... | 11 |
| Figura 4 – <i>Checkpoints</i> do ciclo celular e correspondentes complexos ciclina/cdk..... | 13 |
| Figura 5 – Mecanismo de acção simplificado proposto para os compostos PRIMA-1 ^{MET} e Nutlin-3 | 16 |
| Figura 6 – Regulação do checkpoint na fase G1 do ciclo celular..... | 17 |
| Figura 7 – Mecanismo de acção simplificado proposto para o Palbociclib | 18 |
| Figura 8 – Principais vias de sinalização envolvidas na carcinogénese da tiróide: via MAPK e PI3K-AKT | 21 |
| Figura 9 – Simplificação do possível mecanismo de acção do Tipifarnib | 21 |
| Figura 10 – Esquema representativo da reacção que ocorre no ensaio MTS | 29 |
| Figura 11 – Exemplo do histograma obtido para uma amostra controlo, após análise dos resultados do ensaio de citometria de fluxo com o programa <i>FlowJo</i> , com as diferentes fases do ciclo celular | 32 |
| Figura 12 – Exemplo do gráfico PI/Anexina FITC obtido para uma amostra controlo, após análise dos resultados de citometria de fluxo com o programa <i>FlowJo</i> | 34 |
| Figura 13 – Esquema representativo da ligação do <i>SYBR Green I</i> ao DNA nas reacções de qRT-PCR..... | 38 |
| Figura 14 – Curvas dose-resposta obtidas através de 3 ensaios MTS independentes realizados para as três linhas celulares com diferentes concentrações de Palbociclib ... | 44 |
| Figura 15 – Gráfico representativo da concentração que produziu 50% do efeito máximo (IC50), para as três linhas celulares, após 48h em cultura com o Palbociclib.. | 44 |

| | |
|--|----|
| Figura 16 – Gráficos representativos dos resultados dos ensaios de ciclo e morte celular realizados para a linha celular C643 com diferentes concentrações de Palbociclib | 46 |
| Figura 17 – Resultados dos 3 ensaios de viabilidade celular independentes obtidos às 24, 48 e 72 h após incubação da linha celular C643 com 0,5 μ M de Palbociclib | 47 |
| Figura 18 – Gráficos representativos dos resultados dos ensaios de ciclo e morte celular realizados para a linha celular T238 com diferentes concentrações de Palbociclib | 49 |
| Figura 19 – Resultados dos 3 ensaios de viabilidade celular independentes obtidos às 24, 48 e 72 h após incubação da linha celular T238 com 0,5 μ M de Palbociclib | 50 |
| Figura 20 – Gráficos representativos dos resultados dos ensaios de ciclo e morte celular realizados para a linha celular T235 com diferentes concentrações de Palbociclib | 52 |
| Figura 21 – Resultados dos 3 ensaios de viabilidade celular independentes obtidos às 24, 48 e 72 h após incubação da linha celular T235 com 0,5 μ M de Palbociclib | 53 |
| Figura 22 – Resultados dos 3 ensaios de viabilidade celular independentes obtidos às 24, 48 e 72 h após incubação da linha celular BCPAP com 0,5 μ M de Palbociclib | 54 |
| Figura 23 – Resultados dos 3 ensaios de viabilidade celular independentes obtidos às 24, 48 e 72 h após incubação das células PCCL3 com 0,5 μ M de Palbociclib | 55 |
| Figura 24 – Curvas dose-resposta obtidas de 3 ensaios MTS independentes para as três linhas celulares com diferentes concentrações de Tipifarnib | 57 |
| Figura 25 – Gráfico representativo da concentração que produziu 50% do efeito máximo (IC ₅₀), para as três linhas celulares, após 48h em cultura com o Tipifarnib ... | 57 |
| Figura 26 – Gráficos representativos dos resultados dos ensaios de ciclo e morte celular realizados para a linha celular C643 com diferentes concentrações de Tipifarnib | 59 |
| Figura 27 – Resultados dos 3 ensaios de viabilidade celular independentes obtidos às 24, 48 e 72 h após incubação da linha celular C643 com 0,1 μ M de Tipifarnib | 60 |
| Figura 28 – Gráficos representativos dos resultados dos ensaios de ciclo e morte celular realizados para a linha celular T238 com diferentes concentrações de Tipifarnib | 62 |

| | |
|--|----|
| Figura 29 – Resultados dos 3 ensaios de viabilidade celular independentes obtidos às 24, 48 e 72 h após incubação da linha celular T238 com 0,1 μ M de Tipifarnib | 63 |
| Figura 30 – Gráficos representativos dos resultados dos ensaios de ciclo e morte celular realizados para a linha celular T235 com diferentes concentrações de Tipifarnib | 65 |
| Figura 31 – Resultados dos 3 ensaios de viabilidade celular independentes obtidos às 24, 48 e 72 h após incubação da linha celular T235 com 0,1 μ M de Tipifarnib | 66 |
| Figura 32 – Resultados dos ensaios de qRT-PCR obtidos a partir de RNA extraído das linha celulares C643, T238 e T235, após incubação com 0,1 μ M de Tipifarnib durante 48 h | 68 |
| Figura 33 – Esquema representativo da acção do Palbociclib na via ciclina D1/CDK4/6/Rb durante o ciclo celular | 74 |
| Figura 34 – Esquema representativo da relação entre ciclinas e CDK durante o ciclo celular..... | 81 |
| Figura 35 – Concentração relativa das diferentes ciclinas ao longo do ciclo celular ... | 81 |
| Figura A.1 – Exemplo de esquema de distribuição de diferentes concentrações do composto e controlos em placas de 96 poços usadas nos ensaios de viabilidade | 95 |
| Figura A.2 – Variação da quantidade de DNA na célula ao longo do ciclo celular | 96 |
| Figura A.3 – Representação esquemática da detecção de células apoptóticas por ligação da Anexina-V à fosfatidilserina | 97 |
| Figura A.4 – Representação de um hemocitómetro..... | 98 |

Índice de tabelas

| | |
|--|-----|
| Tabela I – Classificação das neoplasias da tiróide..... | 4 |
| Tabela II – Alterações genéticas mais presentes em tumores avançados da tiróide, PDTC e ATC, numa série de 117 tumores..... | 10 |
| Tabela III – Alterações moleculares somáticas patogénicas detectadas nas linhas celulares C643, T238, T235, BCPAP e nas células PCCL3 | 25 |
| Tabela IV – Número de células plaqueadas para cada linha celular, em cada tipo de placa | 30 |
| Tabela V – <i>Primers</i> utilizados nas reacções de qRT-PCR | 39 |
| Tabela A.I – Volumes dos reagentes usados na cultura de células e nos ensaios de acordo com o tamanho do frasco/placa | 93 |
| Tabela A.II – Informações de massa, solubilidade e concentrações dos <i>stocks</i> de Palbociclib e Tipifarnib | 94 |
| Tabela A.III – Tampões utilizados na extracção de RNA e respectiva função..... | 99 |
| Tabela A.IV – Preparação da solução de PI (50 µg/mL)..... | 103 |
| Tabela A.V – Preparação da solução de PBS-BSA 0,2 % (p/v) | 103 |
| Tabela A.VI – Preparação do tampão de anexina-V | 103 |

Lista de abreviaturas, siglas ou acrónimos

| | |
|-------------------------|--|
| AKT | <i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i> |
| AML | Leucemia Mieloide Aguda (<i>Acute Myeloid Leukemia</i>) |
| Ann | Anexina-V |
| ARF | <i>Alternate Reading Frame</i> |
| ATC | Carcinoma anaplásico da tiróide (<i>Anaplastic Thyroid Carcinoma</i>) |
| ATP | Adenosina trifosfato (<i>Adenosine triphosphate</i>) |
| AXIN1 | <i>AXin INhibitor 1</i> |
| BCL-2 | B-Cell Lymphoma 2 |
| BCPAP | Linha celular de carcinoma papilar da tiróide |
| BAX | BCL2-Associated X Protein |
| bp | Número de pares de resíduos de nucleótidos (<i>base pairs</i>) |
| BRAF | <i>Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1</i> |
| BSA | Albumina de soro bovino (<i>Bovine serum albumin</i>) |
| C643 | Linha celular de carcinoma anaplásico da tiróide |
| Ca²⁺ | Iões de cálcio |
| CaCl₂ | Cloreto de cálcio |
| CCNA2 | Ciclina A2 |
| CCNB1 | Ciclina B1 |
| CCND1 | Ciclina D1 |
| CCNE2 | Ciclina E2 |
| CDK | Cinases dependentes de ciclinas (<i>Cyclin-dependent kinase</i>) |
| CDKI | Inibidores de cinases dependentes de ciclinas (<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>) |
| CDKN | Genes que codificam inibidores de cinases dependentes de ciclinas |
| cDNA | DNA complementar de cadeia simples (<i>complementary DNA</i>) |
| cm | Centímetro |
| CO₂ | Dióxido de carbono |
| C_T | Ciclo de threshold (<i>Threshold cycle</i>) |
| CTNNB1 | <i>Catenin Beta 1</i> |
| D | Aspartato ou Ácido aspártico |

| | |
|----------------|---|
| DEPC | Dietil pirocarbonato (diethylpyrocarbonate) |
| DMSO | Dimetil sulfóxido (<i>Dimethyl sulfoxide</i>) |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| dNTP | Trifosfato de desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>) |
| DO | Densidade óptica |
| DTT | Ditiotreitol (<i>Dithiothreitol</i>) |
| E | Ácido glutâmico ou glutamato |
| E2F | Família de factores de transcrição |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>) |
| EGFR | Receptor do factor de crescimento epidermal (<i>Epidermal growth factor receptor</i>) |
| EIF1AX | <i>Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal</i> |
| ErbB | Família de proteínas que inclui quatro receptores com actividade de tirosina cinase |
| ERBB2 | <i>Receptor Tyrosine Kinase 2</i> |
| ERK | Sinais extracelulares reguladores de cinases (<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>) |
| FACS | <i>Fluorescence-activated cell sorting</i> |
| Fase G0 | Fase não proliferativa do ciclo celular |
| Fase G1 | Intervalo 1 do ciclo celular |
| Fase G2 | Intervalo 2 do ciclo celular |
| Fase M | Mitose |
| Fase S | Fase de síntese de DNA do ciclo celular |
| FBS | Soro fetal bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>) |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FITC | <i>Fluorescein isothiocyanate</i> |
| FTA | Adenoma folicular da tiróide (<i>Follicular Thyroid Adenoma</i>) |
| FTC | Carcinoma folicular da tiróide (<i>Follicular Thyroid Carcinoma</i>) |
| FTI | Inibidor da farnesil transferase (<i>Farnesyl Transferase Inhibitors</i>) |
| g | gramas |
| G | Glicina |
| GAPDH | <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> |

| | |
|-------------------------|---|
| GDP | <i>Guanosine diphosphate</i> |
| GTP | <i>Guanosine 5'-triphosphate</i> |
| GTPases | <i>Guanosine 5'-triphosphatase</i> |
| h | horas |
| HEPES | <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> |
| HPRT | <i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i> |
| IC50 | Concentração do composto para a qual se observa 50 % da inibição da viabilidade celular |
| INK4 | Inibidores da CDK4 |
| K | Lisina |
| L | Leucina |
| LOH | Perda de heterozigotia (<i>Loss Of Heterozygosity</i>) |
| Q | Glutamina |
| m | mili- |
| M | Molar |
| MAPK | Cascata mitogénica activada por proteínas cinase (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>) |
| Mdm2 | <i>Mouse double minute 2 homolog</i> |
| MEK | <i>Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1</i> |
| Mg²⁺ | Iões de magnésio |
| MgCl₂ | Cloreto de magnésio |
| min | minutos |
| MLH | <i>MutL-Homolog family of DNA mismatch repair genes</i> |
| MM | Mieloma múltiplo |
| mRNA | RNA mensageiro |
| MSH | <i>DNA mismatch repair</i> |
| MTC | Carcinoma medular da tiróide (<i>Medullary Thyroid Carcinoma</i>) |
| mTOR | <i>Mammalian target of rapamycin</i> |
| MTS | <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2Htetrazolium</i> |
| n | nano- |
| NaCl | Cloreto de sódio |

| | |
|--------------------------------|--|
| NF | <i>Neurofibromin</i> |
| NMTC | Carcinoma não-medular da tiróide (<i>Non-medullary Thyroid Carcinoma</i>) |
| p | <i>p-value</i> |
| p21 | <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i> |
| p27 | <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i> |
| p57 | <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C</i> |
| PAX8 | <i>Paired box 8</i> |
| PBS | Tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffared Saline</i>) |
| PCCL3 | Células foliculares de tiróide normal de <i>Rattus norvegicus</i> |
| PCR | Reacção em cadeia catalisada pela enzima polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>) |
| PDTC | Carcinoma pouco diferenciado da tiróide (<i>Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma</i>) |
| PI | Iodeto de propídio |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3-cinase (<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>) |
| PIK3CA | <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha</i> |
| PMS | <i>Phenazine methosulfate</i> |
| PPARγ | <i>Peroxisome Proliferation-Activated Receptor type γ</i> |
| PS | Fosfatidilserina |
| PTC | Carcinoma papilar da tiróide (<i>Papillary Thyroid Carcinoma</i>) |
| PTEN | <i>Phosphatase and tensin homolog</i> |
| qRT-PCR | PCR quantitativo em tempo real (<i>quantitative real time PCR</i>) |
| R | Arginina |
| RAS | <i>Rat sarcoma vírus homolog</i> |
| RAF | <i>Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase</i> |
| Rb | Retinoblastoma 1 (gene <i>RB</i> ou <i>RB1</i>) |
| RET | <i>REarranged during Transfection</i> |
| RET/PTC | Rearranjo de cromossomas envolvendo o gene RET |
| RNA | Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>) |
| RNase | Ribonuclease |
| RNaseOut | <i>Ribonuclease inhibitor recombinant</i> |
| rpm | Rotações por minuto |

| | |
|----------------|--|
| RTK | <i>Receptor Tyrosine Kinase</i> |
| S | Serina |
| T235 | Linha celular de carcinoma anaplásico da tiróide |
| T238 | Linha celular de carcinoma anaplásico da tiróide |
| T3 | Triiodotironina |
| T4 | Tiroxina |
| TERT | <i>Telomerase reverse transcriptase</i> |
| TK1 | <i>Thymidine Kinase 1</i> |
| TOP2A | <i>DNA Topoisomerase II alpha</i> |
| TP53 | <i>Tumor Protein 53</i> |
| TSH | Tirotropina ou hormona estimuladora da tiróide (<i>Thyroid-Stimulating Hormone</i>) |
| USH | <i>Usherin</i> |
| UV | Ultravioleta |
| V | Valina |
| X | Codão <i>stop</i> |
| WDTC | Carcinoma bem-diferenciado da tiróide (<i>Well Differentiated Thyroid Carcinoma</i>) |
| WES | <i>Whole Exome Sequencing</i> |
| wt | <i>Wild-type</i> |
| Y | Asparagina |
| % (p/v) | Concentração expressa em peso por volume |
| % (v/v) | Concentração expressa em volume por volume |
| °C | Graus Celsius |
| μ | micro- |

1. Introdução

1.1. A biologia do cancro

Cancro é uma doença que envolve alterações dinâmicas no genoma que conduzem à transformação de células normais a células neoplásicas. O processo pelo qual se dá a acumulação de alterações genéticas que conduzem a essa transformação celular designa-se tumorigénese. Existem mais de 100 tipos de cancros distintos e subtipos de tumores que podem ser encontrados em órgãos específicos (1, 2).

Quando a homeostase de uma célula normal é afectada por mutações, são activados mecanismos de protecção. A célula é estimulada a expressar genes envolvidos na inibição da proliferação celular, na apoptose e na reparação de danos no DNA, de forma a impedir a tumorigénese. No entanto, quando as células ultrapassam estes mecanismos de protecção, a acumulação sucessiva de mutações pode conduzir à formação de tumores (3). Após a formação de tumores, as células tumorais podem adquirir a capacidade de invadir tecidos adjacentes e de entrar na corrente sanguínea, podendo atingir outros locais do organismo e assim formar metástases (4).

Na tumorigénese estão frequentemente alterados dois tipos de genes, os genes supressores de tumor e os oncogenes. Os genes supressores de tumor actuam principalmente na inibição da proliferação celular, sendo necessária a sua inactivação para que haja crescimento tumoral (5). Para serem inactivados, estes genes requerem, normalmente, que haja inactivação de ambos os alelos (6, 7). Pelo contrário, os oncogenes promovem a proliferação celular de forma descontrolada e têm origem em proto-oncogenes que sofrem mutações activadoras e que normalmente afectam um único alelo (8, 9).

Hanahan e Weinberg, em 2000, propuseram 6 características que as células tumorais vão adquirindo ao longo do processo de tumorigénese e que as diferenciam das células normais (*hallmarks of cancer*). Os avanços no conhecimento dos processos de desenvolvimento tumoral têm vindo a evidenciar que a biologia do cancro já não pode ser baseada apenas nas características das células tumorais, mas também na contribuição do microambiente tumoral para a tumorigénese (3). Actualmente foram já definidas dez características principais: resistência à morte celular programada (apoptose), capacidade

de induzir a angiogénese, capacidade replicativa ilimitada, capacidade de invasão dos tecidos e metastização, capacidade de evasão aos inibidores de crescimento, sinalização proliferativa permanente, capacidade de reprogramar a energia metabólica celular, instabilidade genómica e mutação, capacidade de indução de inflamação e capacidade de evasão do sistema imunitário (3) (Figura 1).

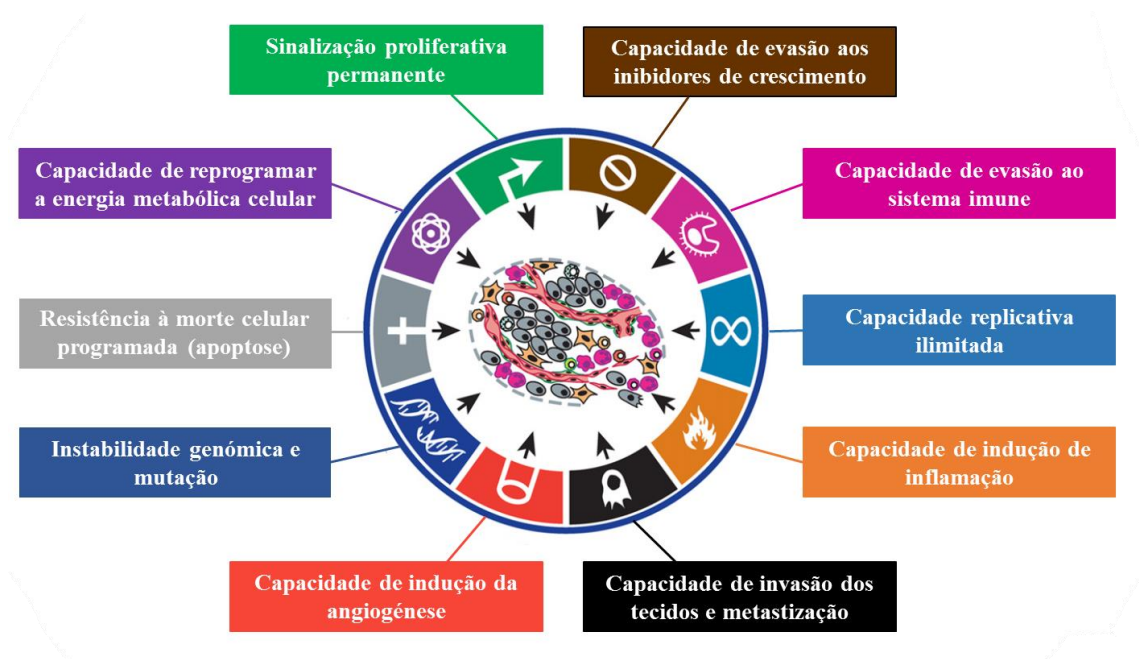


Figura 1 – Diagrama esquemático das novas capacidades necessárias para a progressão tumoral [adaptado de (3)].

1.2. A glândula tiroideia

A tiróide é uma das maiores glândulas endócrinas do corpo humano e divide-se estruturalmente em dois lobos, direito e esquerdo, unidos pelo istmo. Localiza-se no pescoço em frente à traqueia; tem como principal função a produção e secreção de hormonas que estimulam o metabolismo e aumentam a taxa funcional de outros sistemas do organismo. É constituída maioritariamente por dois tipos de células epiteliais (Figura 2): as células foliculares que constituem a maioria do epitélio e são responsáveis pela captação de iodo para a síntese das hormonas tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) e as células parafoliculares ou células C que têm como principal função a secreção da hormona calcitonina, envolvida na regulação dos níveis de cálcio (10-13). Estas hormonas participam no controlo da frequência cardíaca, pressão arterial, temperatura corporal e taxa metabólica basal (13).

Um dos reguladores mais importantes da função da tiróide é a hormona TSH (*Thyroid-Stimulating Hormone*) secretada pela hipófise anterior e que estimula a síntese e secreção das hormonas da tiróide pelas células foliculares (10, 14).

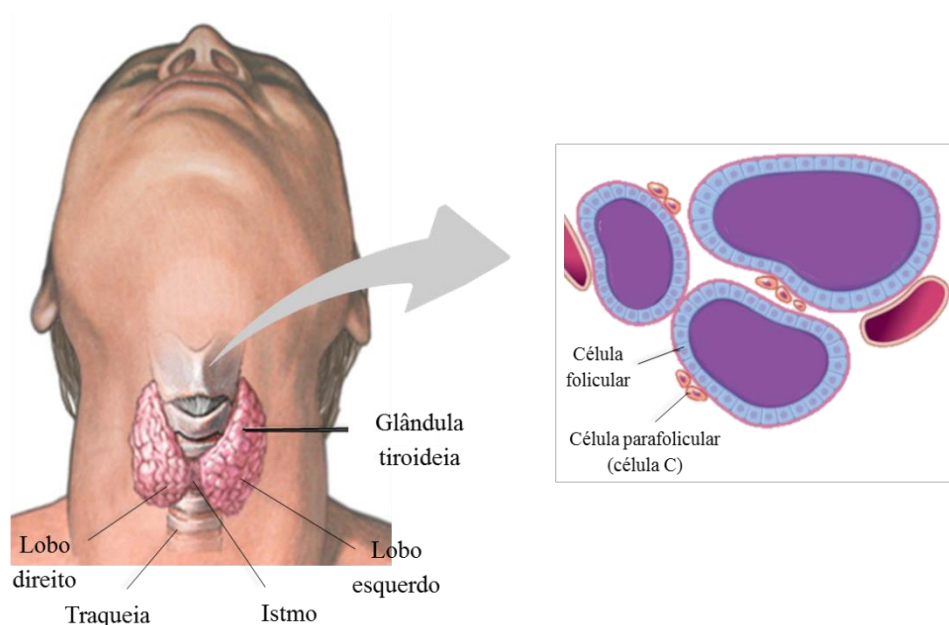


Figura 2 – Posição anatômica da glândula tiroideia [adaptado de (15, 16)].

1.3. Neoplasias da tiróide

O cancro da tiróide é a neoplasia mais comum do sistema endócrino com taxas de incidência que têm aumentado nas últimas décadas, representando já cerca de 2,1 % dos cancros em todo o mundo e afectando maioritariamente o sexo feminino (17).

O aumento que se tem observado na incidência de cancro da tiróide está, em parte, relacionado com a implementação de programas de rastreio que levam a um diagnóstico precoce de carcinomas papilares da tiróide (PTC) (18).

Têm sido identificados vários factores de risco para o aparecimento de cancro da tiróide, sendo os mais relevantes a idade, o sexo, a etnia e a história familiar (17). A exposição a radiação ionizante em criança e na adolescência é um dos factores ambientais que mais influencia o aparecimento de cancro da tiróide pela diminuição da captação de iodo e por causar instabilidade genómica (10, 17).

As neoplasias derivadas do epitélio da tiróide estão caracterizadas de acordo com o tipo de células epiteliais nas quais têm origem. Os tumores com origem nas células parafoliculares, ou células C, são designados por carcinomas medulares da tiróide (*Medullary Thyroid Carcinoma* - MTC) (2 a 3 % dos casos), e os tumores derivados das células foliculares são designados por carcinomas não-medulares da tiróide (*Non-Medullary Thyroid Carcinoma* - NMTC) (90 %) (Tabela I) (10, 17, 19, 20).

Os MTC apresentam agressividade moderada, elevada predisposição para metástases linfáticas e são, normalmente, tratados através de cirurgia, quimioterapia e radioterapia (20).

Tabela I – Classificação das neoplasias da tiróide [adaptado de (11, 20-22)].

| Neoplasias da tiróide | | | | |
|---|---|--|--|---------------------------------------|
| Origem folicular | | | Origem parafolicular (ou células C) | |
| Carcinomas não-medulares (NMTC) | | | Adenomas foliculares (FTA) | Carcinomas Medulares (MTC) 2-3% |
| Carcinomas bem diferenciados (WDTC) | Carcinomas pouco diferenciados (PDTC) 2-10% | Carcinomas indiferenciados ou anaplásicos (ATC) 2-3% | | |
| Carcinoma papilar (PTC) 80-90% | | | | |
| Carcinoma folicular (FTC) 10-15% | | | | |
| Tumores malignos | | | Tumores benignos | Tumores malignos |

1.4. Neoplasias derivadas do epitélio folicular da tiróide (NMTC)

A maioria dos tumores da tiróide têm origem folicular (10, 11, 17) e são designados de acordo com a sua agressividade (Tabela I.1).

Os tumores benignos incluem os adenomas foliculares (*Follicular Thyroid Adenoma* – FTA). O seguimento clínico destas neoplasias pode envolver apenas a sua monitorização periódica ou tiroidectomia quando sintomáticas.

Os carcinomas derivados das células foliculares, NMTC, são tumores malignos, e incluem os carcinomas bem diferenciados da tiróide [*Well Differentiated Thyroid Carcinomas* (WDTC)], dos quais fazem parte o carcinoma folicular da tiróide - *Follicular Thyroid Carcinoma* (FTC) e o carcinoma papilar da tiróide - *Papillary Thyroid Carcinoma* (PTC)], os carcinomas pouco diferenciados da tiróide [*Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma* (PDTC)] e os carcinomas indiferenciados ou anaplásicos da tiróide [*Anaplastic Thyroid Carcinoma* – (ATC)] (19, 20).

1.4.1. Carcinomas bem diferenciados da tiróide (WDTC)

Os carcinomas bem diferenciados manifestam-se principalmente em doentes entre os 20 e os 50 anos de idade, sendo mais frequentes em mulheres do que homens (10). Os PTC e FTC constituem cerca de 90 % dos tumores que derivam do epitélio folicular da tiróide. Estes tumores têm características histológicas e clínicas diferentes, sendo que os PTC correspondem ao histotipo mais comum dentro dos carcinomas diferenciados (80-90 %) (10, 19, 20), seguindo-se os FTC (10-15 %), ambos apresentando, em geral, um bom prognóstico (10, 17).

Histologicamente, ambos apresentam clara diferenciação folicular, sendo que os PTC têm uma caracterização nuclear característica e apresentam com maior frequência metástases linfáticas. Pelo contrário, os FTC não apresentam essa caracterização nuclear específica e metastizam geralmente através da corrente sanguínea para órgãos mais distantes (20).

Têm sido descritas alterações moleculares envolvidas no desenvolvimento destes carcinomas, tais como, mutações e rearranjos em genes que codificam efectores das vias RAS-RAF-MEK-MAPK-ERK (MAPK pathway – *Mitogen-Activated Protein*

Kinase). Em PTC são frequentes mutações no gene *BRAF* (*Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1*) (40-45 %) e rearranjos *RET/PTC* (10-20 %) (19), podendo 10-20% destes tumores, na sua variante folicular, apresentar mutações no gene *RAS* (*RAt Sarcoma virus homolog*). Em FTC são frequentes as mutações no gene *RAS* (40-50 %) (10, 19) e rearranjos *PAX8-PPAR γ* (30-60 %) (10, 19, 23). A activação da telomerase por mutação no promotor do gene *TERT* (*Telomerase reverse transcriptase*) também é crucial no desenvolvimento tumoral, tendo sido detectada entre cerca de 7 e 11 % dos PTC e entre 7 e 27 % dos FTC e estando associada a comportamentos clínicos mais agressivos (24-26).

Os doentes com estes tipos de carcinomas apresentam uma taxa de mortalidade entre 3 e 10 % (27) e são habitualmente tratados com iodo radioactivo após tiroidectomia total (20).

1.4.2. Carcinomas pouco diferenciados da tiróide (PDTC)

Contrariamente aos WDTC, os PDTC estão associados a elevadas taxas de mortalidade (38-57 %) e apresentam um tipo histológico intermédio entre os carcinomas bem diferenciados e os indiferenciados ou anaplásicos, estes últimos quase sempre fatais (27). Os PDTC representam entre 2 e 10 % de todos os tumores da tiróide (10, 19, 20).

Os modelos de progressão tumoral apresentados por diferentes autores sugerem que os PDTC podem ter origem a partir de tumores bem diferenciados da tiróide pré-existent, através de um mecanismo de desdiferenciação, ou podem surgir *de novo* (19, 28).

A nível molecular, as mutações no gene *RAS* são encontradas em cerca de 20 a 40 % dos carcinomas pouco diferenciados e indiferenciados. Tem sido sugerido que os FTA com *RAS* positivo podem ser precursores de FTC (também com *RAS* positivo), podendo esta mutação ser responsável pela transformação e desdiferenciação em PDTC e ATC (19, 20).

As mutações no gene *BRAF* estão presentes em cerca de 10 a 30 % dos PDTC (19, 20, 27), sendo que muitos destes carcinomas apresentam áreas bem diferenciadas. Por vezes, a mutação *BRAF* p.V600E (a mais frequente), mutação *missense* no exão 15

com substituição do aminoácido ácido glutâmico (E) pelo aminoácido valina (V), está presente em ambos os tipos celulares, indicando uma possibilidade desta mutação ser um evento iniciador para a desdiferenciação do tumor (19).

As mutações nos genes *BRAF* e *RAS* são mutuamente exclusivas em PDTC e ATC e são consideradas mutações promotoras nestes tipos de carcinomas. Nos PDTC com mutações no gene *RAS* ocorrem com maior frequência, metástases à distância. No entanto, em PDTC com mutação no gene *BRAF* há uma maior tendência para a metastização nos nódulos linfáticos.

Mutações no gene *TP53* (*Tumor Protein 53*) estão presentes em PDTC (10-30 %) (19, 20, 27), sendo ainda mais frequentes em ATC (50-80 %) (19, 20, 27). De acordo com estes resultados, na série de 22 casos de PDTC e 26 ATC estudados pelo nosso grupo, foram detectadas mutações no *TP53* em 27 % dos PDTC e 42 % dos ATC (29).

As mutações no promotor do gene *TERT* são mais comuns em carcinomas da tiróide avançados, estando presentes em cerca de 40 e 73 % dos PDTC e ATC, respectivamente. Estas mutações representam eventos sub-clonais em PTC, sendo no entanto clonais em PDTC e ATC, o que indica que podem ter um papel fundamental na agressividade dos carcinomas da tiróide (27).

No entanto, os rearranjos *RET/PTC* e *PAX8/PPAR γ* raramente são encontrados em PDTC e ATC, sugerindo que estas alterações genéticas não estão envolvidas no processo de desdiferenciação na tiróide (30).

Os doentes com PDTC são normalmente tratados com cirurgia, iodo radioactivo, quimioterapia e radioterapia e apresentam um pior prognóstico que os WDTC, estando a mortalidade associada principalmente com a ocorrência de metástases ósseas e pulmonares (20).

1.4.3. Carcinomas indiferenciados ou anaplásicos da tiróide (ATC)

Os ATC, que representam 2-3 % de todos os tumores da tiróide (10, 20), são tumores muito agressivos e estão associados a uma taxa de mortalidade muito elevada (~100 %), com uma sobrevivência média de 3 a 6 meses após diagnóstico (27).

Os ATC são caracterizados por apresentarem uma desdiferenciação profunda; perdem por completo (ou quase por completo) a organização estrutural das células

foliculares e não respondem a tratamentos com iodo radioactivo ou quimioterapia, apresentando um crescimento muito rápido (10, 27).

Histologicamente, são normalmente tumores não-encapsulados, com áreas necróticas e hemorrágicas, extremamente invasivos, local e vascularmente, metastizando frequentemente para os ossos e pulmões, sendo a obstrução das vias respiratórias uma causa de morte comum nestes casos (30).

À semelhança do PDTC, os ATC podem coexistir e desenvolver-se a partir de um WDTC ou podem surgir *de novo* (30).

A nível molecular, os ATC apresentam geralmente um número maior de mutações relativamente aos PDTC (2). Os ATC apresentam mutações adicionais comparativamente com os WDTC. As alterações nos genes *PIK3CA* (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha*) e *PTEN* (*Peroxisome Proliferaton-Activated Receptor subtype γ*), efectores principais da via PI3K-AKT-mTOR, são particularmente prevalentes em ATC, sendo detectadas, respectivamente, entre 10-20 % e 5-15 % destes tumores (19, 27). As mutações em *PIK3CA* tendem a apresentar-se em concomitância com a mutação *BRAF* p.V600E. Alterações no número de cópias dos cromossomas são também frequentes nos carcinomas da tiróide mais avançados, principalmente em ATC (27).

As abordagens terapêuticas convencionais são pouco eficazes nos tumores mais agressivos da tiróide, que apresentam uma elevada taxa de mortalidade, sendo por isso necessário o desenvolvimento de novas terapêuticas.

1.5. Perfis de expressão génica globais de tumores da tiróide

O estudo dos perfis de expressão génica dos carcinomas da tiróide tem contribuindo, significativamente, para o conhecimento da biologia molecular destes tumores (31).

1.5.1. Perfis de expressão génica em PDTC e ATC

Em estudos anteriores, o nosso grupo analisou os perfis de expressão globais de tiróide normal, WDTC, PDTC e ATC, utilizando *microarrays* de oligonucleótidos, para compreender quais as principais vias moleculares que contribuem para o

desenvolvimento destes tumores, bem como para identificar novos alvos terapêuticos. Este estudo revelou que genes e vias de sinalização envolvidos na regulação da proliferação celular, ciclo celular, adesão e metastização poderiam estar envolvidos na desdiferenciação dos tumores da tiróide (28, 29).

1.6. Alterações moleculares envolvidas na progressão e desdiferenciação dos carcinomas da tiróide

Os PDTC e ATC podem desenvolver-se *de novo*, mas frequentemente surgem por desdiferenciação de carcinomas papilares ou foliculares (32).

Vários estudos demonstraram que os PDTC e ATC apresentam um elevado número de alterações genómicas e que essa instabilidade genómica pode desempenhar um papel fulcral na progressão dos carcinomas da tiróide (10). A progressão e desdiferenciação dos carcinomas da tiróide pode envolver acumulação de alterações genéticas na via PI3K-AKT-mTOR e noutras vias de sinalização celular (27, 32). Por exemplo, a activação constitutiva oncogénica da via de sinalização MAPK pode promover a instabilidade genómica e a ocorrência de mutações somáticas adicionais durante a progressão tumoral (10).

Com base na informação obtida nos estudos de expressão génica sobre os processos e vias de sinalização celulares mais alterados em PDTC e ATC, o nosso grupo seleccionou um grupo de genes [*HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *TP53*, *CTNNB1* (*Catenin Beta 1*), *PIK3CA*, *PTEN*, *AXIN1* (*AXin INhibitor 1*) e genes que codificam inibidores de cinases dependentes de ciclinas (CDKI) [*CDKN1A* (p21^{CIP1}), *CDKN1B* (p27^{KIP1}), *CDKN2A* (p14^{ARF} e p16^{INK4A}), *CDKN2B* (p15^{INK4B}), *CDKN2C* (p18^{INK4C})] para análise de mutações por sequenciação de Sanger, numa série de 48 tumores (26 ATC e 22 PDTC) e 6 linhas celulares (4 derivadas de ATC e 2 de PDTC) [6].

Nos tumores analisados, foi detectada uma maior frequência de mutações nos genes *TP53* (42 % dos ATC; 27 % dos PDTC) e *RAS* (31 % dos ATC; 18 % dos PDTC), observando-se mútua exclusividade para estas mutações. Para além destes dois genes, os inibidores de cinases dependentes de ciclinas (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN2C*), também estavam frequentemente alterados nos PDTC (14-20 %) e nos ATC (10-14 %). Por outro

lado, mutações nos genes *BRAF*, *CTNNB1* e *AXIN1* foram raramente detectadas neste estudo (28, 29).

Em suma, neste estudo foram identificados os genes *RAS*, *TP53* e os genes codificantes de CDKI como sendo os mais frequentemente mutados e que podem ser fundamentais para o desenvolvimento de PDTC e ATC.

Em 2015, Kunstman e o seu grupo detectaram 2674 mutações somáticas (121/amostra) por sequenciação global do exoma (WES – *Whole Exome Sequencing*) em 22 casos de ATC e 4 linhas celulares estabelecidas de ATC, sendo que a análise ontológica revelou que a maioria das variantes se encontravam nas vias de sinalização RAS, MAPK e ErbB. Foram encontradas mutações em genes associados ao cancro, mas que previamente não tinha sido associados à tumorigénese da tiróide, como por exemplo, *MTOR* (*mammalian Target Of Rapamycin*), *NF* (*neurofibromin*), *MLH* (*MutL-Homolog family of DNA mismatch repair genes*), *MSH* (*DNA mismatch repair*), *ERBB2* (*Receptor Tyrosine Kinase 2*), *EIF1AX* (*Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal*) e *USH2A* (*Usherin*). Mutações somáticas em genes já estabelecidos para cancro da tiróide foram também detectadas em 64 % dos tumores, incluindo mutações no *BRAF*, *TP53*, genes da família *RAS*, *PIK3CA*, *CDKN1B*, *CDKN2C*, *CTNNB1* e *RET* (*REarranged during Transfection*). (33)

Mais recentemente, Landa e o seu grupo realizaram um estudo de WES numa série de 84 PDTC e 33 ATC, que permitiu identificar um grande espectro de mutações somáticas, fusões génicas e alterações do número de cópias génicas, que diferenciam estes dois tipos de tumores. Neste estudo, os genes encontrados mais frequentemente mutados foram o *TP53*, *RAS*, *BRAF* e *TERT* (Tabela II) (2).

Tabela II – Alterações genéticas mais presentes em tumores avançados da tiróide, PDTC e ATC, numa série de 117 tumores analisados, com 84 PDTC e 33 ATC [adaptado de (2)].

| | Alterações genéticas | | | | | | | | | | | | |
|------|----------------------|------------|-------------|-------------|-------------|---------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|----------------|-------------------------------------|
| | <i>BRAF</i> | <i>RAS</i> | <i>NRAS</i> | <i>HRAS</i> | <i>KRAS</i> | <i>EIF1AX</i> | <i>PIK3CA</i> | <i>PTEN</i> | <i>TERT</i> | <i>TP53</i> | <i>PI3K/AKT</i> | <i>RET/PTC</i> | <i>PAX8/PPARγ</i> |
| PDTC | 33% | 28% | 21% | 5% | 2% | 11% | 2% | 4% | 40% | 8% | 11% | 6% | 4% |
| ATC | 45% | 24% | 18% | 6% | 0% | 9% | 18% | 15% | 73% | 73% | 39% | 0% | 0% |

O gene *EIF1AX* foi recentemente descrito como um novo gene associado a carcinomas da tiróide, estando presente em cerca de 11 e 9% dos PDTC e ATC, respectivamente, e significativamente associado com mutações no *RAS*, sendo neste caso preditivo de uma menor sobrevivência (2).

Conforme já foi referido, parte dos PDTC e ATC apresentam mutações em genes que também estão envolvidos em PTC e FTC, como por exemplo, *RAS* e *BRAF*, o que sugere que estas alterações podem estar envolvidas no processo de dediferenciação. No entanto, estes tumores podem adquirir também novas mutações durante o processo de dediferenciação, como por exemplo, nos genes *TP53*, *TERT*, *PTEN*, *PIK3CA*, *EIF1AX*, *CTNNB1* e *CDKN* (2, 27, 34). Por outro lado, os rearranjos *RET/PTC* e *PAX8/PPAR* raramente são encontrados nos carcinomas mais agressivos, sugerindo que estas alterações genéticas não predisõem a célula para a dediferenciação (30).

Na Figura 3 encontra-se esquematizado o processo de progressão tumoral na tiróide, designadamente as alterações moleculares envolvidas no desenvolvimento de WDTC, PDTC e ATC (28, 29).

Mutações encontradas exclusivamente nas formas mais agressivas de tumores da tiróide podem estar associadas a estádios mais avançados da progressão tumoral e, por outro lado, mutações encontradas em WDTC, mas não em PDTC ou ATC, poderão estar mais associadas a eventos relacionados com iniciação tumoral (10).

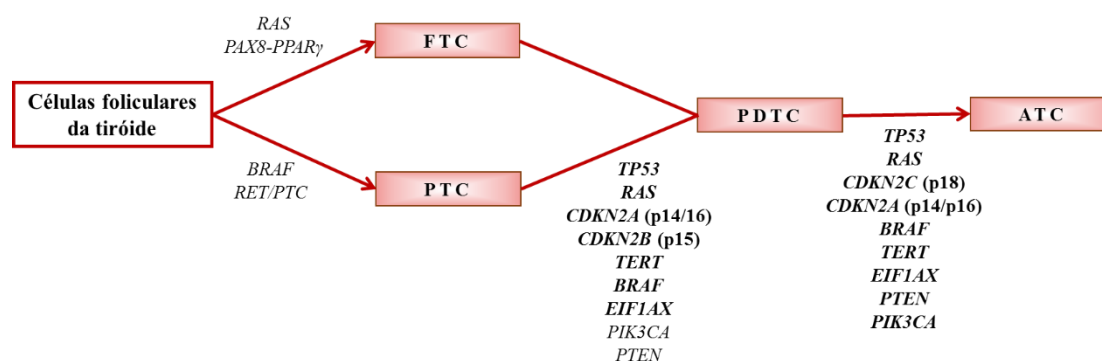


Figura 3 – Esquema representativo da progressão dos carcinomas da tiróide. Destacados a negrito, estão os genes mais frequentemente alterados (>5 %) [adaptado de (2, 10, 29)].

1.7. Novos alvos moleculares e abordagens terapêuticas para formas agressivas de cancro da tiróide

Neste projecto, propusemo-nos a testar novos compostos terapêuticos que têm como alvo genes e vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento dos tumores mais agressivos da tiróide, dado que as terapêuticas convencionais não são eficazes neste tipo de tumores (35). Actualmente existe uma vasta gama de compostos que têm como alvo mutações em alguns dos genes mais alterados em PDTC e ATC. No presente projecto foram seleccionados para estudo os alvos moleculares *RAS*, *CDKN2A* (p16^{INK4A}) e *CDKN2B* (p15^{INK4B}). Desta forma, foram testados compostos dirigidos aos referidos alvos: o Tipifarnib é um inibidor da farnesil transferase, inibindo a farnesilação do *HRAS* e consequentemente, actuando na via MAPK/MEK/ERK (36); o Palbociclib regula o ciclo celular, funcionando como inibidor das CDK4/CDK6 (reguladas pelos CDKI p15^{INK4B} e p16^{INK4A}) (37).

Nas secções que se seguem será discutida a selecção dos alvos moleculares e compostos estudados neste trabalho.

1.7.1. Processos celulares: ciclo celular e proliferação celular

Tal como foi referido anteriormente, os genes encontrados mais frequentemente mutados em PDTC e ATC estão envolvidos em processos de regulação do ciclo e proliferação celular.

Uma célula reproduz-se através de uma série de eventos em que duplica o seu conteúdo celular e se divide em duas novas células, designados por ciclo e proliferação celular, respectivamente. O ciclo celular é constituído por quatro fases distintas: a fase S em que ocorre a síntese/replicação do DNA, duas outras fases antes e após a fase S, designadas respectivamente de G1 e G2, e a fase M, em que ocorre a divisão em duas células-filhas idênticas (mitose e citocinese). As fases G1, S e G2 correspondem à interfase, período em que a célula aumenta de volume e tamanho (38).

Ao longo do ciclo celular vão existindo pontos específicos de regulação que controlam se a célula está apta ou não para prosseguir para a fase seguinte do ciclo, sendo que a desregulação deste ciclo pode levar à divisão celular excessiva, um dos

processos envolvidos na tumorigénese. O ciclo celular é regulado por *checkpoints* com proteínas que promovem a progressão, ciclinas E, A e D e cinases dependentes de ciclinas (CDK) e por outras proteínas que induzem a paragem do ciclo celular, os inibidores de cinases dependentes de ciclinas (CDKI) (6, 38).

Os diferentes complexos ciclina/CDK actuam em fases diferentes do ciclo celular de forma a impedir a sua progressão quando ocorrem erros no DNA, quando os processos celulares não estão completos ou quando o ambiente extracelular não é favorável. Quando a célula permanece no *checkpoint* da fase G1 por tempo suficiente, pode entrar numa fase não proliferativa (G0) podendo permanecer senescente por longos períodos (Figura 4) (38).

O mecanismo envolvido no *checkpoint* em G1 é o mais bem estudado, onde actua a proteína p53, que é reguladora da transcrição e activa a transcrição de genes que codificam proteínas inibidoras das CDK. A presença de danos no DNA provoca um aumento na concentração e na actividade das proteínas p53 e p21 (CDKI), sendo que a proteína p21 se liga ao complexo ciclina E/CDK2 e previne a entrada da célula na fase S (38).

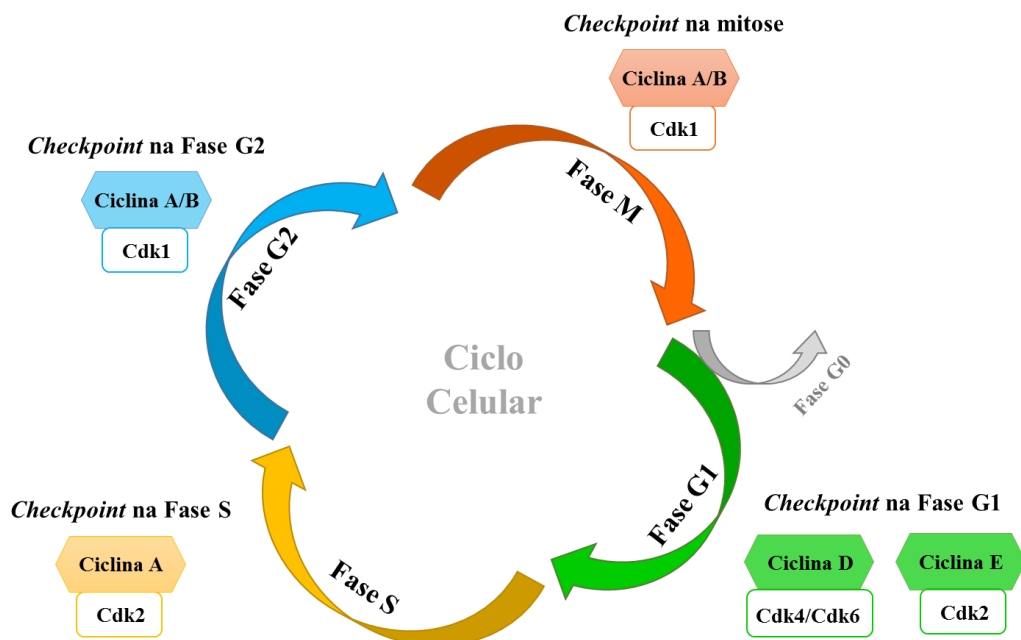


Figura 4 – *Checkpoints* do ciclo celular e correspondentes complexos ciclina/CDK [(2, 38, 39)].

A paragem do ciclo em G1 permite que a célula tente reparar os danos no DNA antes da replicação. Se o DNA estiver gravemente alterado, a proteína p53 induz a célula a entrar em apoptose. Contudo, se a p53 está ausente ou alterada, há replicação de DNA com elevada taxa de mutações o que pode conduzir à tumorigénese (38).

1.7.2. Alvos moleculares p53 e p14^{ARF} – compostos PRIMA-1^{MET} e Nutlin-3

O gene *TP53* está envolvido em diversos eventos celulares: paragem do ciclo celular em G1, apoptose, senescência e envelhecimento (40). Este gene está localizado no cromossoma 17p13 e encontra-se frequentemente inactivado em diversos tumores, através de mutação pontual e perda de heterozigotia (*LOH - Loss Of Heterozygosity*). A proteína p53 *wild-type* (*wt*) é capaz de impedir o crescimento anormal de células transformadas, actuando como supressor tumoral (10, 41).

Em condições normais, os níveis desta proteína permanecem muito baixos. Em resposta a *stress* celular, esta proteína que actua como factor de transcrição e é rapidamente acumulada no núcleo da célula através de modificações químicas: fosforilação e acetilação (41).

Um dos reguladores mais importantes da proteína p53 é a proteína Mdm2 (*Mouse double minute 2 homolog*), que promove a ubiquitinação da p53, levando à sua exportação do núcleo para degradação no proteossoma (40). A proteína Mdm2 controla os níveis de expressão da proteína p53 por feedback negativo (41).

A proteína p14^{ARF} codificada pelo gene *CDKN2A* actua como supressor tumoral na via da p53; liga-se à proteína Mdm2 e bloqueia a sua actividade de ligase, prevenindo a degradação da p53 pela Mdm2 e conduzindo assim à estabilização e acumulação da p53. Estando a p53 activa, por activação da p21, poderá haver paragem do ciclo celular se os danos no DNA forem reparáveis (na fase G1) ou indução da apoptose caso não o sejam (40). Assim, a proteína p53 previne a multiplicação de células com alterações no DNA e a consequente a tumorigénese (42).

A perda de função desta proteína induz instabilidade genómica resultando em deficiências nos sistemas de reparação do DNA e consequentemente na progressão tumoral (10). Cerca de 95 % das mutações encontradas neste gene estão localizadas na sequência que codifica a região central da proteína responsável pela ligação ao DNA,

o que induz a perda de capacidade de se ligar aos seus genes-alvo e de desempenhar a função de supressão tumoral (41). Os genes-alvo da p53 mutada são diferentes da p53 *wt*, sendo maioritariamente oncogénicos ao invés de supressores tumorais, ou seja, desempenham funções contrárias às da p53, induzindo proliferação celular, sobrevivência e resistência a fármacos, o que facilita a progressão tumoral (43).

Actualmente existem vários compostos que têm como alvo a proteína p53 mutada, sendo o PRIMA-1^{MET} (ou APR-246) um deles. PRIMA-1^{MET} é um análogo metilado de PRIMA-1 e tem a capacidade de reactivar mutantes da p53, fazendo com que esta adquira algumas das suas funções *wt* (44, 45). Alguns estudos revelam que este composto em conjunto com a quimioterapia pode induzir apoptose das células tumorais, apesar de não ser totalmente conhecido o mecanismo molecular envolvido nessa reactivação (45).

PRIMA-1^{MET} já foi testado em ensaios pré-clínicos, com resultados positivos, em linfoma, cancro da mama, colon e pulmão, em mieloma, a partir de 2011 em ensaios clínicos de fase II em leucemia mieloide aguda (AML) sem resultados, em 2013 em ensaios clínicos em doentes com cancro da próstata e em 2015 em ensaios fase I/II em cancro colorectal (46-49). Para nosso conhecimento, este composto nunca foi testado em carcinomas da tiróide.

Na ausência de p14^{ARF}, devido a mutações inactivadoras no gene que codifica esta proteína, a Mdm2 passa a estar sempre activa, não havendo paragem do ciclo celular, pelas razões referidas anteriormente. O composto Nutlin-3, que protege a p53 *wt* da degradação mediada pela proteína Mdm2, conduz também à paragem do ciclo celular ou à apoptose, (46, 50). Este composto “mimetiza” a função da p14^{ARF} ligando-se ao domínio de ligação da Mdm2 à p53, permitindo assim que sejam activados os alvos pró-apoptóticos da p53 (Figura 5).

Este composto foi testado isoladamente em ensaios pré-clínicos em AML, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiplo (MM), cancro da próstata e neuroblastoma, com resultados positivos (51-55). Foi também testado em combinação com o Sorafenib, um inibidor de receptores com actividade de tirosina cinase, em linhas celulares de AML e carcinomas renais (56, 57). Em cancro da tiróide, o composto Nutlin-3 foi apenas testado em linhas celulares e em combinação com Bortezomib, onde foi observado um

aumento dos níveis de expressão de genes envolvidos na apoptose e na citotoxicidade celular (53).

Os compostos Nutlin-3 e PRIMA-1^{MET} foram seleccionados para estudo em diferentes linhas celulares de ATC, num trabalho desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo, mas os resultados preliminares mostraram não haver uma resposta significativa com os compostos isolados ou combinados (22).

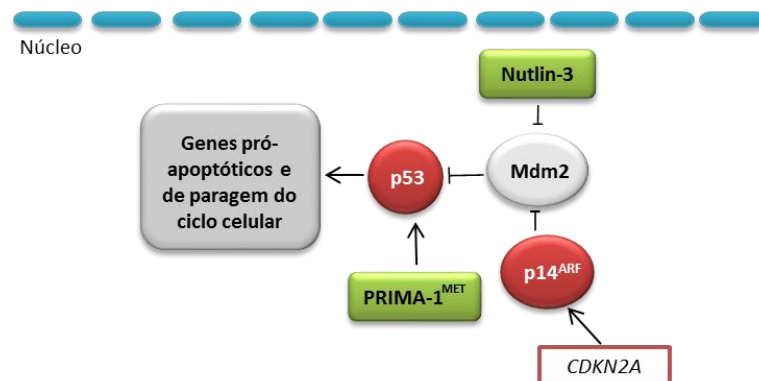


Figura 5 – Mecanismo de acção simplificado proposto para os compostos PRIMA-1^{MET} e Nutlin-3 [adaptado de (2, 22)].

1.7.3. Alvos moleculares p15^{INK4B} e p16^{INK4A} – composto Palbociclib

As CDK4 e CDK6 são os reguladores principais da transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular (58).

Por sinais externos há formação do complexo ciclina D/CDK4/6 que fosforila a proteína Rb1 (retinoblastoma 1), inativando-a. A proteína Rb1 activa (desfosforilada) funciona como repressor do factor de transcrição E2F (*family of transcription factors*), impedindo que o ciclo celular avance (Figura 6). Na ausência deste complexo, a célula consegue proliferar devido aos mecanismos redundantes que possui. Neste caso, o complexo ciclina E/CDK2, funcionaria de igual modo, fosforilando a proteína Rb1 (58). No entanto, se o DNA da célula estiver danificado, os CDKI irão inibir a associação desses complexos permitindo que a Rb1 hipofosforilada se ligue ao factor de transcrição E2F e impeça a progressão do ciclo celular.

Os CDKI p15^{INK4B} e p16^{INK4A} previnem a fosforilação da proteína Rb1, funcionando como supressores tumorais (10, 58, 59).

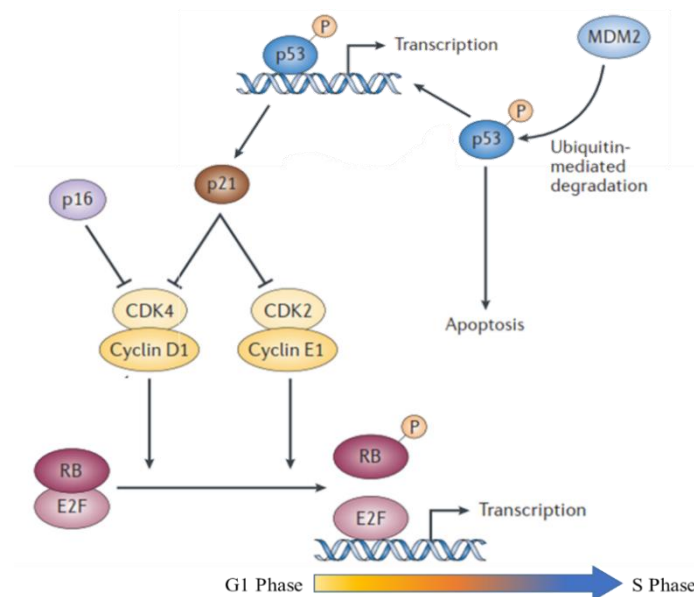


Figura 6 – Regulação do *checkpoint* na fase G1 do ciclo celular [adaptado de (10)].

Nos últimos anos, a tumorigénese tem sido frequentemente associada a mutações em ciclinas, CDK e em CDKI em vários tipos de tumores humanos (6). Os genes *CDKN2A* (p14^{ARF} e p16^{INK4A}) e *CDKN2B* (p15^{INK4B}) estão localizados no mesmo *locus* cromossómico (9p21) e uma deleção homozigótica deste *locus* é muito comum em vários tipos de tumores, como por exemplo, em melanoma e em leucemias, afectando as 3 proteínas p14^{ARF}, p15^{INK4B} e p16^{INK4A}. Num estudo de Lee realizado em 2008, foi identificada uma deleção do *locus* dos genes *CDKN2A* e *CDKN2B* numa amostra de ATC e ausência de expressão da p16^{INK4A} em 89% dos ATC analisados (60). Tal como foi referido anteriormente, também num estudo efectuado pelo nosso grupo, os genes que codificam CDKI foram encontrados frequentemente alterados em PDTC e ATC (29). Nestes casos, quando ocorrem erros no DNA, o sistema não é capaz de impedir a transição de fases do ciclo celular e há multiplicação de células com danos, contribuindo para a tumorigénese. Os inibidores de CDK encontram-se normalmente sub-expressos em neoplasias da tiróide [5, 23]. Nos últimos anos, vários inibidores selectivos das CDK4/6 têm sido desenvolvidos de forma a compensar a sua função numa célula alterada, sendo o composto PD-0332991, também designado por Palbociclib, um dos inibidores de CDK da nova geração (58, 61).

O Palbociclib inibe as CDK4/6, através da sua ligação ao local de ligação do ATP (adenosina trifosfato), bloqueando a fosforilação da Rb1 e levando à paragem do ciclo celular em G1. Dado que bloqueia a CDK6, que tem um papel importante na angiogénese, alguns estudos sugerem que o Palbociclib também tem uma função antiangiogénica (Figura 7) (58, 61, 62).

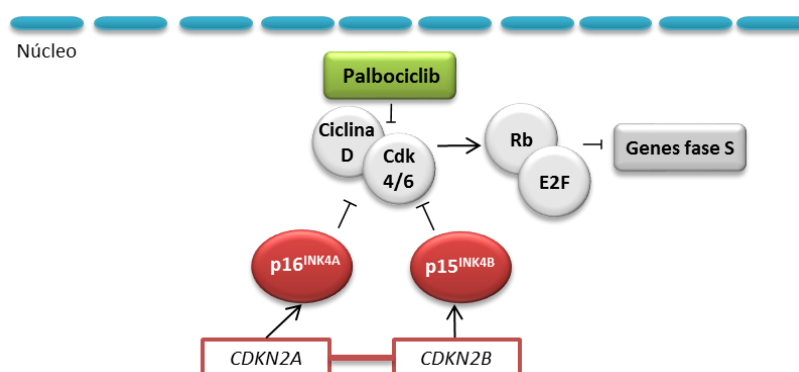


Figura 7 – Mecanismo de acção simplificado proposto para o Palbociclib [adaptado de (22)].

Este composto mostrou reduzir significativamente o crescimento do tumor e conduzir à sua regressão apenas em células *RB* positivas de cancro da mama, sugerindo que não interfere com outros alvos antiproliferativos para além das CDK4/6 (Figura 7) (62).

O Palbociclib já foi testado em ensaios clínicos de fase III em cancro da mama, em fase I de na Doença de *non-Hodgkin* e em ensaios pré-clínicos em diferentes tipos de cancro. Foi também testado em diferentes linhas celular e em xenotransplantes de modelo de rato, incluindo neuroblastoma, glioblastoma, carcinoma colorectal e sarcomas com resultados positivos, demonstrando sempre uma actividade antiproliferativa (61, 63).

De acordo com a informação a que tivemos acesso, este composto ainda não foi testado em cancro da tiróide.

1.7.4. Alvo molecular *HRAS* – composto Tipifarnib

As vias de sinalização MAPK e PI3K-AKT desempenham um papel fundamental na regulação da proliferação e sobrevivência celular e na tumorigénese [2].

As proteínas Ras são GTPases (*Guanosine 5'-triphosphatase*) localizadas na superfície interna da membrana celular que transmitem sinais para receptores com actividade de tirosina cinase (RTK – *Receptor Tyrosine Kinase*) e para receptores acoplados a proteínas G, através das vias MAPK e PI3K-AKT (32).

A proteína Ras activa, vai activar a proteína Braf. Braf é uma proteína com actividade de serina/treonina cinase que, quando activada pela proteína Ras, promove uma cascata de fosforilações que conduzem à activação constitutiva da via MAPK. (64). A proteína ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) é activada por fosforilação e entra no núcleo onde promove a transcrição de oncogenes e inibe a regulação de genes supressores tumorais (Figura 8) (20).

A família de genes humanos *RAS* inclui os genes *HRAS*, *KRAS* e *NRAS* localizados nos cromossomas 11, 12 e 1, respectivamente. As mutações no gene *RAS* aumentam a afinidade da ligação da proteína Ras ao GTP (*Guanosine 5'-triphosphate*) ou impendem a hidrólise do GTP ligado, mantendo a proteína sempre activa (65). Em

cancro da tiróide, mutações pontuais no codão 61 de *NRAS* e *HRAS* são as mais comuns, sendo responsáveis por uma conformação activa da proteína (32).

A proteína Braf também pode ser activada por mutação, sendo a p.V600E a mais frequente em cancro da tiróide, levando igualmente a uma activação da via MAPK, independente dos sinais de crescimento (19, 32).

Quanto à via PI3K-AKT, a classe de proteínas mais estudada na tumorigénese é a PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*). Conforme foi referido atrás, sinais externos activam os receptores RTK na membrana celular e conduzem à activação da proteína Ras e subsequentemente à activação da PI3K. Esta proteína activa cataliza reacções sucessivas de fosforilação, incluindo a fosforilação da AKT (forma activa). A proteína AKT entra no núcleo da célula onde induz a expressão de oncogenes. No citoplasma, a proteína AKT fosforilada, pode também activar outra via de sinalização, mTOR. Um dos reguladores negativos desta via é a proteína PTEN; sendo uma fosfatase, é responsável por inibir a fosforilação da AKT e bloquear a transmissão do sinal através da via PI3K-AKT (Figura 8) (20). Mutações nos genes *PIK3CA*, *PTEN* e *RAS* estão presentes em carcinomas pouco diferenciados e anaplásicos da tiróide, activando constitutivamente esta via e podendo contribuir para o desenvolvimento tumoral (2).

A farnesilação das isoformas do *RAS* é um passo limitante na sua modificação pós-tradução para que adquira actividade oncogénica. Se o *RAS* mutado não estiver activo, o ciclo celular não progride e a célula entra em apoptose (66). Desta forma, têm sido estudados e desenvolvidos compostos que possam inibir essa farnesilação, designados inibidores da farnesil transferase (FTI – *Farnesyl Transferase Inhibitors*) (67).

O composto Tipifarnib é um inibidor da farnesil transferase (FTI), que actua na via MAPK-ERK induzindo efeitos celulares antiproliferativos, por alterar a localização da proteína Ras na membrana celular, necessária para a sua activação (Figura 9), inibindo o crescimento de linhas celulares de cancro com *HRAS* mutado (18, 66). As linhas com *NRAS* e *KRAS* mutado não são afectadas pelo Tipifarnib, porque a sua prenilação é realizada através de outra enzima, a geranilgeranil transferase, sendo que a isoforma *HRAS* não é prenilada pela actividade enzimática redundante da geranilgeranil transferase, mas sim pela actividade da farnesil transferase. Por esta razão, a geranilgeranil transferase permite o escape do tumor ao tratamento com o Tipifarnib

quando este apresenta *NRAS* e *KRAS* mutado, mas não quando apresenta *HRAS* mutado (18).

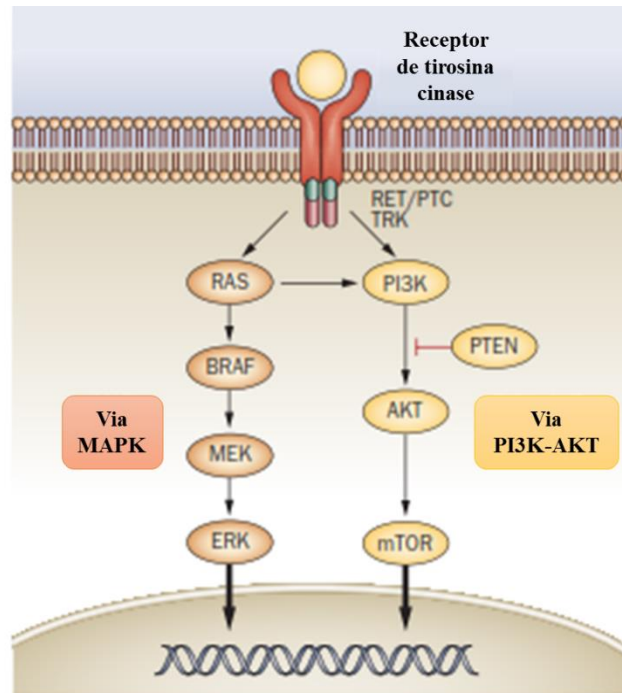


Figura 8 – Principais vias de sinalização envolvidas na carcinogénese da tiróide: via MAPK e PI3K-AKT. Estas vias estão envolvidas na propagação de sinais de vários receptores com actividade de tirosina cinases presentes na membrana celular para o núcleo regulando a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência da célula [adaptado de (19)].

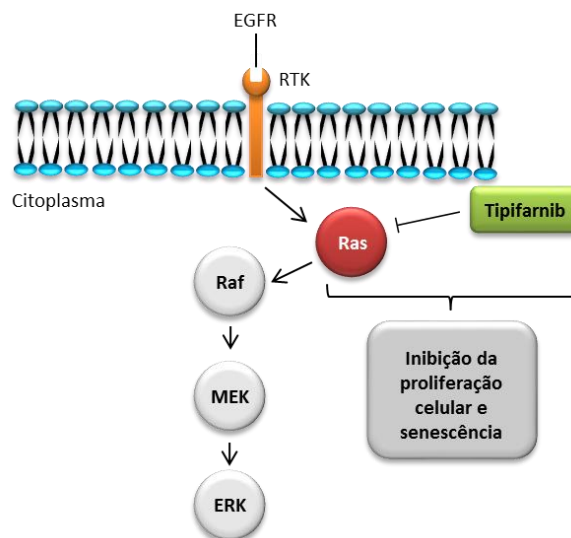


Figura 9 – Simplificação do possível mecanismo de acção do Tipifarnib [adaptado de (22)].

O Tipifarnib já foi testado em ensaios clínicos de fase II em Leucemia mielóide aguda (AML) e de fase III na Doença de Hodgkin's (68). Em doentes com cancro da tiróide (MTC e WDTC), foram testados os níveis de toxicidade do Tipifarnib em combinação com Sorafenib (inibidor de receptores com actividade de tirosina cinase, como por exemplo, receptores das proteínas RET e do factor de crescimento vascular endotelial) em ensaios clínicos de fase I (66). Foi testado também em combinação com Gefitinib, inibidor da fosforilação do EGFR (Receptor do factor de crescimento epidérmico), em linhas celulares, uma delas de ATC (C643), sendo que o Tipifarnib melhorou o efeito do Gefitinib, diminuindo a viabilidade celular (69).

Tendo em conta a acção do Palbociclib e do Tipifarnib nos alvos moleculares mais frequentemente alteradas em PDTC e ATC é expectável que estes dois compostos possam ser úteis para uma intervenção terapêutica com impacto na sobrevivência dos doentes. Desta forma, neste projecto estes dois compostos foram seleccionados para estudo em modelos celulares da tiróide.

2. Objectivos

Neste projecto de Mestrado pretendeu-se estudar o efeito de compostos específicos direccionados a alvos moleculares terapêuticos, identificados anteriormente pelo nosso grupo, em carcinomas pouco diferenciados (PDTC) e anaplásicos da tiróide (ATC), de forma a identificar novas terapêuticas para estas formas agressivas de cancro.

Mais concretamente, o nosso objectivo foi estudar o efeito de dois compostos, Palbociclib e Tipifarnib, na viabilidade celular, no ciclo e morte celular, em modelos celulares de tiróide (ATC, carcinoma bem diferenciado e células normais).

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultura de células

Neste estudo, foram usadas linhas celulares humanas de ATC: C643 (disponível comercialmente) e T238 e T235 (cedidas gentilmente pela Doutora Lúcia Roque da UIPM-IPOLFG). Foi também utilizada uma linha celular de carcinoma papilar da tiróide humano, BCPAP (cedida gentilmente pela Doutora Paula Soares do IPATIMUP - Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto) e células PCCL3, provenientes da clonagem de células foliculares de tiróide normal de *Rattus norvegicus* (gentilmente cedidas pelo Professor Dumont do Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, Bélgica).

Cada linha celular apresenta alterações moleculares somáticas patogénicas, previamente identificadas (tabela III).

Tabela III – Alterações moleculares somáticas patogénicas detectadas nas linhas celulares C643, T238, T235, BCPAP e nas células PCCL3 [adaptado de (28, 29, 70, 71)].

| Genes com alterações moleculares patogénicas | | | | | | |
|--|------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|---------------|
| Linhas celulares | <i>HRAS</i> | <i>BRAF</i> | <i>CDKN2A</i> | <i>CDKN2B</i> | <i>TP53</i> | <i>PIK3CA</i> |
| C643 | p.G13R (heterozigotia) | - | delecção homozigótica (sem tradução) | delecção homozigótica (sem tradução) | p.R248Q (hemizigotia) | - |
| T238 | - | p.V600E | p.L63R | - | p.S183X (<i>LOH</i>) | p.E542K |
| T235 | - | p.V600E | - | - | - | - |
| B-CPAP | - | p.V600E (homozigotia e heterozigotia) | ne | ne | p.D259Y | - |
| PCCL3 | - | - | - | - | - | - |

Legenda:

LOH – perda de heterozigotia (*Loss of Heterozygosity*)

ne – não estudado.

3.1.1. Descongelção das células

As células foram criopreservadas em azoto líquido, numa solução de congelação contendo FBS (soro fetal bovino) com 10 % (v/v) de DMSO (Dimetil sulfóxido) (*Sigma-Aldrich*).

As ampolas foram retiradas do azoto líquido e passadas para gelo, sendo posteriormente descongeladas. Após toda a suspensão estar descongelada, transferiu-se todo o conteúdo com uma seringa de 1mL para um tubo com 20 mL de meio de cultura suplementando com FBS 10 % (v/v), L-glutamina 1X e antibiótico-antimicótico 1X. O meio de cultura utilizado foi o correspondente a cada linha celular. Centrifugou-se o tubo durante 5 minutos a 1200 rpm (rotações por minuto) (*Labofuge 400, Heraeus Instruments*, raio do rotor = 170 mm) e retirou-se o sobrenadante de forma a eliminar o DMSO. Ressuspendeu-se o *pellet* em 10 mL de meio de cultura suplementado e transferiu-se a suspensão celular para um frasco de cultura com o restante volume de meio de cultura. Os volumes de meio de cultura utilizados para cada tipo de frasco e placas de cultura encontram-se descritos na tabela A.I do anexo I).

No dia seguinte à descongelção, renovou-se o meio de cultura.

3.1.2. Criopreservação das células

A criopreservação das células foi feita a partir de frascos de cultura de 75 cm³ com uma confluência celular de cerca de 90-100 %. Após destacar as células do frasco com tripsina-EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) (ver secção 3.1.3) procedeu-se à centrifugação da suspensão celular (1200 rpm, 5 min), removeu-se o sobrenadante e posteriormente, ressuspendeu-se o *pellet* em 2 mL de uma solução de congelação e transferiu-se para uma ampola de congelação de 2 mL. A ampola foi primeiramente colocada a -70 °C e posteriormente em azoto líquido (-196 °C).

3.1.3. Propagação e expansão das células

Todas as linhas celulares foram propagadas numa estufa com 5 % de CO₂, em frascos de 75 cm³ no meio de cultura apropriado, sendo este renovado cada 3 a 4 dias para renovação dos nutrientes.

As linhas celulares C643 e BCPAP foram mantidas e propagadas em meio de cultura RPMI-1640 (*Lonza*TM, Suíça) e as linhas celulares T238 e T235 em meio de cultura RPMI-1640 modificado, com HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid] (*Sigma*, EUA). Ambos os meios foram suplementados com L-Glutamina (*GIBCO*TM, EUA) 1X, Antibiótico-Antimicótico (*GIBCO*TM) 1X e com soro fetal bovino (*FBS – Fetal Bovine Serum*) (*GIBCO*TM; *Biochrom*TM, UK) 2 % (v/v) ou 10 % (v/v), de acordo com o procedimento a realizar. Por outro lado, as células PCCL3 foram mantidas e propagadas em meio de cultura *Hams F-12 Coon's Modification with L-Glutamine* (*Euroclone*, Itália), suplementado com *FBS* (*GIBCO*TM, EUA) 5 % (v/v), insulina 1 mg/L (*Sigma-Aldrich*, EUA), hormona estimuladora da tiróide (TSH) 1 mUI/ml (*Sigma-Aldrich*, EUA), apotransferrina 1 mg/ml (*Sigma-Aldrich*), L-Glutamina (*GIBCO*TM, EUA) 1X e antibiótico-antimicótico (*GIBCO*TM, EUA) 1X.

Todas as linhas celulares utilizadas são aderentes e pelo menos, duas vezes por semana, quando as células atingiam uma confluência entre 85 e 100 %, eram divididas e novamente colocadas em cultura.

Para a passagem das células, após remoção de todo o meio de cultura metabolizado, as células eram lavadas com PBS 1X sem magnésio e sem cálcio (*Phosphate Buffared Saline -Mg²⁺/Ca²⁺*; *GIBCO*TM, EUA) e destacadas pela incubação com tripsina-EDTA (*Invitrogen*TM, EUA) 1X a 37 °C durante 30-45 segundos no caso das C643 e T238 e 60-90 segundos no caso das T235, BCPAP e PCCL3. A tripsina era posteriormente neutralizada por adição de meio de cultura correspondente a cada linha celular, suplementado com FBS 10 % (v/v). Cerca de 1/3 da suspensão celular era então transferido para um novo frasco de cultura e as células ressuspensas no volume final de meio de cultura adequado.

Outras informações sobre a descongelação, criopreservação e propagação de células estão descritas na secção 8.1 do anexo I. Os volumes de meio de cultura e de reagentes usados estão descritos na tabela A.I do anexo I.

3.2. Compostos testados

3.2.1. Preparação das soluções *stock*

As soluções *stock* concentradas de cada composto, PD-0332991/Palbociclib (*Selleckchem*, EUA) e R115777/Tipifarnib (*Selleckchem*, EUA), foram preparadas em DMSO (*Sigma-Aldrich*, EUA) de acordo com a sua solubilidade em água e em DMSO a 25 °C (tabela A.II, anexo I), em ambiente estéril. Visto ser recomendado evitar a congelação e descongelação das soluções *stock*, as mesmas foram preparadas em várias alíquotas de forma a serem utilizadas apenas uma vez, e foram posteriormente congeladas a -80 °C, como recomendado pela empresa (*Selleckchem's Inhibitor Handling Instructions*).

3.2.2. Diluições seriadas dos compostos

As diferentes concentrações de cada composto foram preparadas em tubos de 50 mL estéreis, em diluições seriadas, com volumes de meio de cultura e composto apropriados. Nas diluições, manteve-se a percentagem de DMSO entre 0,01 % e 0,3 % em todos os ensaios e para todas as linhas celulares de forma a reproduzir a percentagem de DMSO nas diferentes condições de cada ensaio com composto e nos ensaios controlo (sem composto). Foram mantidas concentrações baixas de DMSO, visto ser um composto que poderia causar diferenciação celular ou até mesmo morte celular (72).

As diluições seriadas foram preparadas imediatamente antes de proceder à adição do meio às células de forma a prevenir qualquer alteração ou degradação do composto. Para as diluições foi utilizado meio de cultura suplementado com FBS 2 % (v/v).

3.3. Estudo da viabilidade metabólica celular por ensaio de MTS

Os ensaios de viabilidade metabólica celular foram realizados para obter a curva dose-resposta de cada composto, para cada linha celular.

O MTS é um método colorimétrico que permite obter uma estimativa da viabilidade metabólica de um grupo de células condicionadas, em relação a um controlo não tratado. Foram usadas as seguintes soluções: MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], composto de tetrazólio (Promega, EUA) e PMS (phenazine methosulfate) (AppliChem, EUA), um mediador da transferência de electrões. O MTS é bio-reduzido por enzimas desidrogenases, presentes em células metabolicamente activas, em formazano, produto que é solúvel no meio de cultura (Figura 10). A quantidade de formazano é medida num espectrofotómetro a 490 nm, sendo o valor da absorvância directamente proporcional à actividade metabólica das células e consequentemente, directamente relacionado com o número de células vivas em cultura.

Este ensaio foi também usado inicialmente para determinar o número de células ideal a plaquear em cada ensaio.

Nestes ensaios foram usadas apenas 3 linhas celulares: C643, T238 e T235 com ambos os compostos Palbociclib e Tipifarnib.

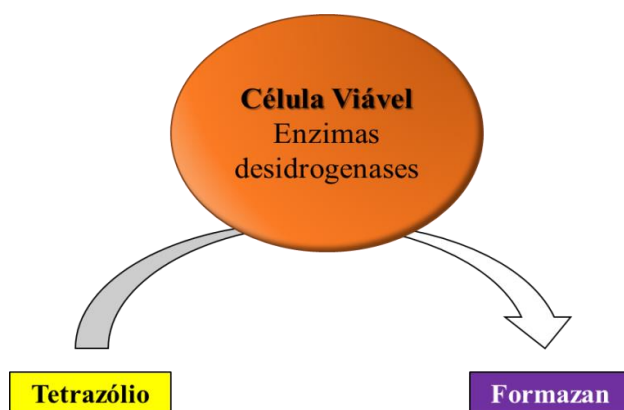


Figura 10 – Esquema representativo da reacção que ocorre no ensaio MTS [adaptado de (73)].

Utilizando células obtidas a partir de frascos T-75, com uma confluência óptica de 85-100 %, plaquearam-se as células em placas de 96 poços (*Falcon*, EUA), num volume final de 100 μL . A concentração celular por poço, para cada linha celular, encontra-se descrita na tabela IV. As diferentes condições dos ensaios, designadamente as diversas concentrações dos diferentes compostos, foram testadas em triplicado, excepto para os controlos não tratados, para os quais foram feitas 8 réplicas por placa. Os brancos foram também feitos em triplicado, sem meio e sem células (esquema da placa na Figura A.1 do anexo I).

Após adesão das células à placa ($t=0$), o meio de cultura foi removido de todos os poços e foi adicionado novo meio suplementado com FBS 2 % (v/v), com as respectivas diluições dos compostos. Nos poços controlo, o meio de cultura foi apenas substituído por meio com FBS 2 % (v/v) sem composto.

Após 48 h de exposição das células ao composto realizou-se o ensaio MTS para avaliar o efeito de cada composto na viabilidade celular metabólica.

Imediatamente antes da adição do reagente do MTS a cada poço da placa de 96 poços (*Falcon*, EUA) com as células, o conteúdo da alíquota de PMS (95 μL) foi misturado com a alíquota de MTS (1900 μL). Vinte microlitros dessa mistura PMS/MTS foram adicionados a cada poço contendo $\sim 100 \mu\text{L}$ de meio de cultura, assim como aos poços controlo e aos poços que correspondem aos brancos. A placa foi incubada a 37 °C num ambiente húmido, com 5 % de CO_2 .

Tabela IV – Número de células plaqueadas para cada linha celular, em cada tipo de placa.

| Número de células plaqueadas | | | |
|------------------------------|--|---|--|
| | Placa de 96 poços (0,36 cm^2) | Placa de 12 poços (3,6 cm^2) | Placa de 6 poços (9,5 cm^2) |
| C643 | $0,1 \times 10^4$ | 2×10^4 | 4×10^4 |
| T238 | $0,4 \times 10^4$ | 3×10^4 | 9×10^4 |
| T235 | $0,5 \times 10^4$ | $5,5 \times 10^4$ | 11×10^4 |

A leitura da absorvância das placas foi feita 2 h após o início da incubação num leitor de placas, *Microplate Reader iMark* (BioRad, EUA), e usando o *software* MPM6. Os resultados apresentados correspondem a 2 horas de incubação com MTS/PMS, pois os ensaios de optimização mostraram ser este o tempo de reacção óptimo (os resultados dos ensaios de optimização não foram apresentados nesta tese). A percentagem relativa a um controlo foi assumida como correspondendo a 100 % de viabilidade e os dados obtidos foram analisados utilizando o *Microsoft Excel* e o *GraphPad Prism 6.0*.

3.4. Estudo do ciclo celular por citometria de fluxo

Testou-se o efeito dos compostos Palbociclib e Tipifarnib no ciclo celular. Nestes ensaios foram usadas as linhas celulares C643, T238 e T235.

As células foram plaqueadas em placas de 12 poços (*VWR International*) num volume de 1 mL de meio suplementado com FBS 10 % (v/v) por poço, tendo em conta a respectiva concentração celular para cada linha celular (tabela IV) e mantidas a 37 °C num ambiente húmido com 5 % de CO₂. Cada condição de tratamento foi testada em duplicado, havendo 6 controlos, distribuídos pelas várias placas. Após adesão celular, o meio de cultura foi substituído por novo meio suplementado com FBS 2 % (v/v) de forma a manter as células em *starvation* moderada, para a sincronização do ciclo celular com o respectivo composto a testar (t=0). Nos controlos não tratados, o meio de cultura foi apenas substituído por meio novo, suplementado com FBS 2 % (v/v).

Após 48 h, as células foram recolhidas. Neste ensaio, o sobrenadante não é necessário, sendo descartado. As células foram lavadas com 500 µL de PBS 1X sem magnésio e sem cálcio, destacadas com 150 µL de tripsina-EDTA 1X e neutralizadas com 250 µL de meio de cultura correspondente, suplementado com FBS 10 % (v/v). As células foram recolhidas para tubos de 1,5 mL, previamente identificados, e centrifugadas a 1300 rpm durante 3 minutos (*eppendorf Centrifuge 5810R*, raio do rotor = 180 mm). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 300 µL de PBS 1X. Procedeu-se a nova centrifugação a 1300 rpm durante 3 minutos, descartou-se o sobrenadante e ressuscitou-se o *pellet* de células em 1 mL de etanol a 70 % (v/v) [100 % (v/v), *Merck*, Alemanha] para fixar as células e permeabilizar a membrana. Os tubos foram guardados a 4 °C, durante pelo menos 6 h e no máximo 1 semana. Após esse período, as células foram

centrifugadas a 1300 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante descartado e as células marcadas com 100 μ L de solução de iodeto de propídio 1X (1:50) (PI *stock*, 500 μ g/mL, *Sigma*, EUA) (preparação da solução descrita na tabela A.IV do anexo II) e incubadas durante 40 minutos a 37 °C (banho-maria). Após incubação, sem descartar o sobrenadante, foi adicionado 1 mL de PBS 1X e as células foram centrifugadas a 1300 rpm durante 10 minutos a 4 °C (*eppendorf Centrifuge 5810R*, raio do rotor = 180 mm). Por fim, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 100 μ L de PBS 1X - Bovine Serum Albumin (BSA) (≥ 99 %, *Sigma*, Portugal) [0,2 % (p/v)] (preparação da solução descrita na tabela A.V do anexo II) no momento da análise por citometria de fluxo (*FACScaliburTM* – *Becton Dickinson*). A aquisição foi obtida pelo *software BD Cell QuestTM* e os histogramas de ciclo celular obtidos foram analisados usando o programa *FlowJo_V10* (*Tree Star Inc*, EUA), tendo-se excluído os agregados e as células mortas. Os histogramas permitiram-nos identificar as diferentes fases do ciclo celular, assim como saber o número de células presente em cada fase (Figura 11). Informação mais detalhada sobre a análise do ciclo celular encontra-se descrita na secção 8.4 do anexo I.

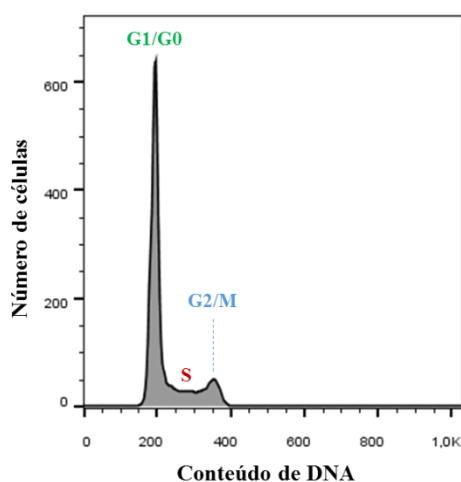


Figura 11 – Exemplo do histograma obtido para uma amostra controlo, após análise dos resultados do ensaio de citometria de fluxo com o programa *FlowJo*. As diferentes fases do ciclo celular encontram-se representadas.

3.5. Estudo da morte celular por citometria de fluxo

Testou-se o efeito dos compostos Palbociclib e Tipifarnib na morte celular (necrose e/ou apoptose). Nestes ensaios foram usadas as linhas celulares C643, T238 e T235.

O procedimento experimental para os ensaios de morte celular foi igual ao descrito para os ensaios de ciclo celular (descritos na secção 3.4) até ao momento da recolha das células após as 48h de incubação. Cada condição de tratamento foi testada em duplicado. Nos ensaios de morte celular recolheu-se o meio de cultura (sobrenadante) dos poços para tubos de 1,5 mL, uma vez que é esperado que as células mortas se encontrem nesse sobrenadante. Após recolha do sobrenadante, as células aderentes foram lavadas, destacadas e ressuspensas, como descrito na secção 4, e recolhidas novamente para o tubo correspondente. Procedeu-se à centrifugação a 1300 rpm durante 3 minutos (*eppendorf Centrifuge 5810R*, raio do rotor = 180 mm), descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em PBS 1X-BSA [0,2 % (p/v)]. Depois de nova centrifugação e eliminação do sobrenadante, as amostras correspondentes aos “brancos” foram marcadas da seguinte forma: O branco foi apenas marcado com 100 µL de tampão de anexina-V (preparação da solução descrita na tabela A.VI do anexo II), o branco PI foi marcado com uma solução contendo 100 µL de tampão de anexina-V e 1 µL de PI 500 µg/mL (*Sigma*) e o branco anexina-V foi marcado com uma solução contendo 100 µL de tampão de anexina-V e 1 µL de anexina-V (100 µg/mL) (*BioLegend*, EUA). As células foram marcadas com 100 µL de uma solução contendo tampão de anexina-V (*Annexin-V binding buffer*), 1 µL de PI (500 µg/mL) e 1 µL de anexina-V (100 µg/mL). Depois de proceder à incubação das células durante 15 minutos (marcação), no escuro e à temperatura ambiente, estas foram ressuspensas em 100 µL de tampão de anexina-V e analisadas por citometria de fluxo (*FACScaliburTM* – *Becton Dickinson*). Os “brancos” foram usados para ajustar os parâmetros de aquisição de células pelo *software BD Cell QuestTM*. Os dados da aquisição foram novamente analisados usando o programa *FlowJo_V10* (*Tree Star Inc*, EUA) e obtendo-se um gráfico PI/Anexina FITC. As células vivas correspondem às células sem marcação, representadas no quadrante PI-/Ann-; as células em necrose correspondem ao quadrante PI+/Ann-, marcadas apenas com PI; as células pré-apoptóticas ao quadrante PI-/Ann+, marcadas com Anexina-V e a morte total foi calculada pelo somatório de células que se encontraram marcadas, correspondendo aos quadrantes PI+/Ann-, PI-/Ann+ e PI+/Ann+ (Figura 12). Informação mais detalhada

sobre a marcação de células nos ensaios de morte celular encontra-se descrita na secção 8.5 do anexo I.

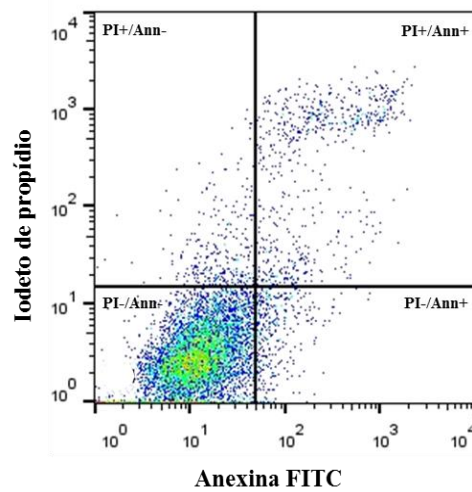


Figura 12 – Exemplo do gráfico PI/Anexina FITC obtido para uma amostra controlo, após análise dos resultados de citometria de fluxo com o programa *FlowJo*. As diferentes fases da morte celular encontram-se representadas pela marcação a que correspondem.

3.6. Estudo da viabilidade celular por contagem directa em hemocitómetro

Testou-se o efeito dos compostos Palbociclib e Tipifarnib na viabilidade celular por contagem directa em hemocitómetro (0.100 mm, *Neubauer Improved*) pelo método de exclusão do azul de tripano. Nestes ensaios foram usadas as celulares C643, T238, T235, BCPAP e PCCL3 para estudo do Palbociclib e as linhas C643, T238 e T235 para estudo do Tipifarnib.

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços (*VWR International*) com meio de cultura correspondente a cada linha celular, suplementado com FBS 10 % (v/v). Depois da adesão das células à placa, ou seja, cerca de 24 h após o plaqueamento (t=0h), o meio de cultura foi substituído por meio suplementado com FBS 2 % (v/v) com o composto, nos poços “tratados” e sem composto nos poços referentes aos controlos. Cada condição de tratamento foi testada em duplicado. Em cada poço foram colocados 2 mL de suspensão celular com o número de células adequado.

A contagem de células foi realizada às 24 h, 48 h e 72 h, e em cada *timepoint* foram analisados para cada condição 2 controlos e 2 “tratados”. Para a contagem, cada poço foi lavado com 500 µL de PBS 1X, seguindo-se a tripsinização (300 µL tripsina-EDTA), a neutralização da tripsina e a recolha para um tubo. Posteriormente adicionou-se azul de tripano 0,4 % (*Biochrom AG*, Alemanha), numa diluição 1:3 em PBS, à suspensão celular recolhida, numa diluição de 1:2, transferiu-se 10 µL para o hemocitómetro e procedeu-se à contagem.

3.7. Extracção de RNA

A extracção de RNA a partir de células foi feita de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante do *RNeasy Mini Kit* (*QIAGEN*, Alemanha).

As extracções de RNA foram realizadas a partir dos ensaios de viabilidade celular pelo método do azul de tripano (secção 3.6) das linhas celulares C643, T238 e T235, sendo as células recolhidas de placas de 6 poços às 48 h para tubos de 1,5 mL. Posteriormente, centrifugou-se os tubos a 1200 rpm durante 5 minutos (*eppendorf Centrifuge 5810R*, raio do rotor = 180 mm) e removeu-se o máximo de sobrenadante. O *pellet* foi congelado a -70°C até se proceder à extracção de RNA.

Na extracção, após descongelação, ressuspendeu-se o *pellet* em 400 µL tampão de lise celular RLT (tabela A.III do anexo I) e depois adicionou-se o mesmo volume de etanol a 70 % (v/v) e homogenizou-se a mistura. Transferiu-se a amostra para uma coluna *RNAeasy* (máximo 700 µL) colocada num tubo colector de 2 mL e centrifugou-se a coluna a 10000 rpm durante 15 segundos (*eppendorf Centrifuge 5417C*, raio do rotor = 95 mm). Quando o volume da amostra excedia os 700 µL, fazia-se nova centrifugação com o volume restante de amostra, na mesma coluna e nas mesmas condições. O sobrenadante recolhido para o tubo colector foi sempre descartado depois das centrifugações. Posteriormente, adicionou-se 700 µL de tampão RW1 (tabela A.III do anexo I) à coluna e centrifugou-se novamente a 10000 rpm durante 15 segundos (*eppendorf Centrifuge 5417C*, raio do rotor = 95 mm), de forma a remover todos os produtos sem afinidade para a coluna. Descartou-se o eluído, adicionou-se 500 µL de tampão RPE (tabela A.III do anexo I) à coluna e voltou a centrifugar-se a 10000 rpm durante 15 segundos (*eppendorf Centrifuge 5417C*, raio do rotor = 95 mm). Descartou-se o eluído e repetiu-se a adição de 500 µL de tampão RPE, mas neste caso seguido de uma centrifugação de 10000 rpm, durante 2 minutos (*eppendorf Centrifuge 5417C*, raio do rotor = 95 mm) para garantir que todos os resíduos de etanol fossem removidos da membrana da coluna. Descartou-se novamente o eluído e voltou a centrifugar-se a coluna a 10000 rpm durante 1 minuto (*eppendorf Centrifuge 5417C*, raio do rotor = 95 mm).

Por fim, a coluna foi transferida para um novo tubo colector de 1,5 mL, foram adicionados 50 µL de água *RNase-free* (tabela A.III do anexo I) directamente sobre a membrana da coluna e, após 5 minutos, a coluna foi novamente centrifugada a 10000 rpm durante 1 minuto (*eppendorf Centrifuge 5417C*, raio do rotor = 95 mm) para eluir o RNA. Por último, o RNA obtido foi quantificado no *Nanodrop* e armazenado a -70 °C.

3.8. Quantificação do RNA por espectrofotometria

A quantificação do RNA extraído a partir de amostras biológicas foi feita por espectrofotometria no *NanoDrop* (*Thermo Scientific, NanoDrop 2000*, EUA). As leituras espectrofotométricas foram feitas a 260 e 280 nm, sendo estes comprimentos de ondas correspondentes aos picos máximos de absorção dos ácidos nucleicos e das proteínas, respectivamente.

Primeiramente fez-se a leitura de um branco com água bidestilada estéril e em seguida, a leitura de 2 µL de RNA de cada amostra.

A razão entre as leituras a 260 nm e 280 nm (DO_{260}/DO_{280}) foi utilizada para aferir a pureza do RNA de cada amostra. É esperada uma razão entre 1,8 e 2,0 em amostras de boa qualidade, sendo que uma contaminação significativa com proteínas ou fenol leva a uma redução desse valor (74).

3.9. Síntese de cDNA por transcrição reversa de RNA

O RNA foi extraído de três linhas celulares, C643, T238 e T235 e foi utilizado para a síntese de DNA complementar de cadeia simples (cDNA). De acordo com a quantificação do *NanoDrop*, foi utilizado na reacção de síntese de cDNA o volume correspondente a 2 µg de RNA para cada amostra. Adicionou-se a quantidade de água bidestilada tratada com DEPC (Dietil pirocarbonato) necessária para obter um volume de 12 µL.

Para a síntese de cDNA foram preparadas duas misturas reaccionais para cada amostra:

- a) 0,4 µL de desoxirribonucleótidos (dNTPs) 25 mM (*InvitrogenTM*, EUA) + 0,1 µL de *random primers* 3 µg/µL (*InvitrogenTM*, EUA). 0,5 µL desta mistura foram adicionados a cada amostra.
- b) 2 µL de ditioneitol (DTT) 0,1 M (*InvitrogenTM*, EUA) + 0,5 µL *RNaseOutTM* (*Ribonuclease inhibitor recombinant*) 40 U/µL, (*InvitrogenTM*, EUA) + 4 µL solução tamponada (*First Strand Buffer*) 5X (*InvitrogenTM*, EUA) + 0,5 µL transcriptase reversa (*SuperScript II RT*) 200 U/µL (*InvitrogenTM*, EUA). 7,5 µL desta mistura foram adicionados a cada amostra.

Cada reacção de síntese de cDNA ficou com um volume final de 20 µL.

Por fim, os tubos foram colocados no termociclador (*T3 thermocycler*, *Biometra*, Alemanha), e incubados 10 minutos a 25 °C, 50 minutos a 42 °C e 15 minutos a 70 °C (para inactivar os enzimas intervenientes na reacção). Os cDNAs sintetizados foram armazenados a -20 °C e posteriormente utilizados nas reacções de PCR quantitativo em tempo real.

3.10. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

O PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) é baseado no princípio do PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para amplificar ácidos nucleicos, mas que permite a detecção e quantificação por fluorescência dos produtos de amplificação no momento em que ocorre a reacção de amplificação.

Neste estudo foi usado o PCR em tempo real recorrendo a *SYBR Green I* (fluoróforo intercalante) (*Applied Biosystems*, EUA) com o intuito de avaliar o efeito dos compostos testados nos níveis de expressão génica. O *SYBR Green I* liga-se inespecificamente ao DNA de cadeia dupla (Figura 13), emite pouca fluorescência quando está livre em solução, mas a sua fluorescência aumenta quando se liga ao DNA em cadeia dupla, que é gerado durante as reacções de amplificação do qRT-PCR. Assim, o sinal de fluorescência é proporcional à quantidade de DNA presente na amostra e aumenta à medida que a sequência alvo é amplificada. (Informação mais detalhada na secção 8.10 do anexo I).

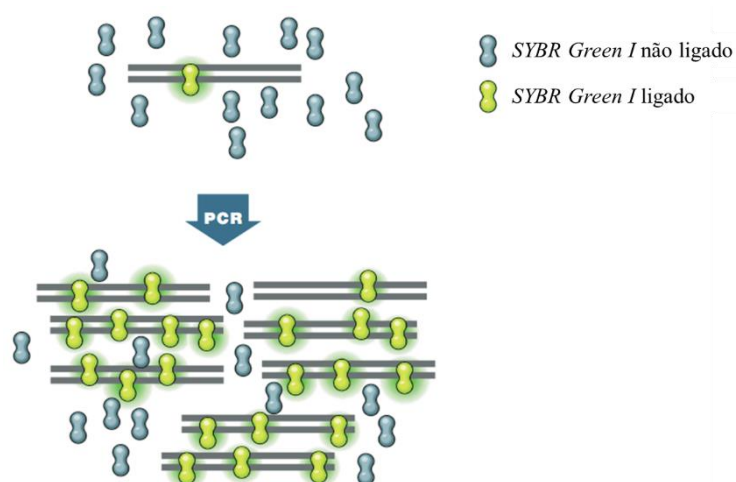


Figura 13 – Esquema representativo da ligação do *SYBR Green I* ao DNA nas reacções de qRT-PCR [adaptado de (75)].

3.10.1. Desenho de *primers* para qRT-PCR

Tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios de ciclo celular, as reacções de qRT-PCR foram realizadas para genes que estão envolvidos nos *checkpoints* do ciclo celular. Foram analisados os genes codificantes das seguintes proteínas: ciclina A2, ciclina B1, ciclina D1, CDK1 e CDK2.

Os *primers* foram desenhados utilizando o *software primer3* e *Oligo v5.0* (tabela V), sendo, no final, feito o *BLAST* dos *primers* através da plataforma *UCSC Genome Browser*.

Tabela V – *Primers* utilizados nas reacções de qRT-PCR.

| Gene-Proteína | Primer Forward 5' -> 3' | Tamanho | Primer Reverse 5' -> 3' | Tamanho | Amplicon |
|--------------------|-------------------------|---------|-------------------------|---------|----------|
| CCNA2 - Ciclina A2 | AAATCAGTTTCTTACCCAATACT | 23 bp | AAGGCAGCTCCAGCAATAAC | 20 bp | 147 bp |
| CCNB1 - Ciclina B1 | ACATGAGAGCCATCCTAAT | 19 bp | CAACCAGCTGCAGCATCTT | 19 bp | 144 bp |
| CDC2 - CDK1 | TTTTCAGAGCTTTGGGCACT | 20 bp | AGGCTTCCTGGTTTCCATTT | 20 bp | 100 bp |
| CDK2 - CDK2 | TCTGGGAATACAGGGGTGAA | 20 bp | GGGTGGTGGAGGCTAACTT | 19 bp | 88 bp |
| CCND1 - Ciclina D1 | CACGCGCAGACCTTCGTT | 18 bp | CCATGGAGGGCGGATTG | 17 bp | - |

Os *primers* foram desenhados com os *softwares primer3* e *Oligo v5.0*.

pb – pares de base

3.10.2. Curvas de eficiência e curvas de *melting*

As curvas padrão e as eficiências de reacção foram avaliadas para todos os genes alvo em estudo, assim como para os genes *housekeeping* usados. As curvas de *melting* também foram analisadas em cada ensaio para avaliar a especificidade da amplificação. (Informação mais detalhada na secção 8.10 do anexo I).

3.10.3. Análise de dados do qRT-PCR - Quantificação relativa

Para a análise de dados do qRT-PCR foi utilizado o Método de Livak, também conhecido por $2^{-\Delta\Delta C_T}$, que assume que tanto o gene referência como o gene de interesse são amplificados com uma eficiência próxima de 100 %.

A eficiência e a reprodutibilidade dos ensaios de qRT-PCR são dois critérios fundamentais que determinam a optimização desses ensaios. Para isso é necessário construir uma curva-padrão através de diluições seriadas de uma amostra com concentração conhecida e que expresse o gene em estudo. A partir dessa curva identifica-se uma regressão linear entre o valor de C_T obtido durante a amplificação para cada diluição e o logaritmo da quantidade inicial de ácido nucleico alvo presente em cada amostra. A partir da regressão linear, determina-se R^2 , que demonstra a linearidade dos resultados e obtém-se o declive da recta padrão de forma a calcular a eficiência da reacção. (Informação mais detalhada na secção 8.10 do anexo I).

Após confirmação da eficiência de reacção, a diferença relativa dos níveis de expressão do gene de interesse em diferentes amostras pode ser determinada a partir da normalização dos C_T do gene de interesse em relação ao gene de referência, tanto para a amostra teste como para o calibrador (ΔC_T). Posteriormente o ΔC_T da amostra é normalizado com o ΔC_T do calibrador ($\Delta\Delta C_T$), obtendo-se um rácio normalizado a partir da fórmula inicial, $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Para corrigir variações na quantidade de DNA presente em cada amostra, é amplificado em paralelo um gene endógeno (*housekeeping*) para o qual também é construída uma curva-padrão. Inicialmente foi usado o gene *GAPDH* (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), mas as variações de C_T s eram muito grandes entre

diferentes qRT-PCR, tendo passado a usar-se o *HPRT* (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*). (Informação mais detalhada na secção 8.10 do anexo I).

3.10.4. Análise de expressão de alvos moleculares por qRT-PCR

Analizou-se por qRT-PCR a expressão dos genes *CCNA2* (ciclina A2), *CCNB1* (ciclina B1), *CDC2* (CDK1), *CDK2* e *CCND1* (ciclina D1) em amostras controlo não tratadas e em amostras tratadas com Palbociclib ou Tipifarnib das linhas celulares C643, T238 e T235. A expressão destes genes foi analisada em relação à expressão do gene *HPRT*, sendo a curva de calibração traçada a partir de 6 concentrações diferentes de uma amostra padrão (controlo não tratado): 500; 250; 100; 50; 25 e 10 ng. As amplificações de qRT-PCR para cada amostra foram realizadas em triplicado, havendo sempre controlos negativos, também em triplicado, para cada gene, por cada placa de 96 poços (*MicroAmp Optical 96-well reaction plate, Applied Biosystems*). As reacções de qRT-PCR com *SYBR Green I* foram realizadas no *LightCycler 480 II Instrument* (*Roche Applied Science, Alemanha*), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (*Roche Applied Science, Alemanha*), com algumas alterações, que de seguida se descreve:

Em gelo, preparou-se uma mistura reacção para cada amostra e por cada gene contendo 0,5 µL de *primer forward* e *primer reverse* 10 pmol/µL (*Sigma-Aldrich, EUA*) (tabela V), 10 µL de *LightCycler^R 480 SYBR Green I Master 2X* concentrada (que contém o fluoróforo *SYBR Green I*, dNTPs, *FastStart Taq DNA Polimerase*, tampão de reacção e *MgCl₂*) (*Roche Applied Science, Alemanha*) e 8 µL água bidestilada tratada com DEPC.

As reacções de qRT-PCR foram iniciadas com uma desnaturação a 95 °C durante 10 minutos, que foi seguida de 35 ciclos de amplificação. Em cada ciclo ocorreu um passo de desnaturação a 95 °C durante 15 segundos, um passo de hibridação dos *primers* a 60 °C durante 30 segundos, e um passo de extensão a 72 °C durante 15 segundos. O *software LightCycler^R 480 SW 1.5* (*Roche Applied Science*) foi utilizado na análise dos resultados obtidos.

3.11. Análise estatística

Os dados foram obtidos através de vários replicados em ensaios independentes e neste trabalho, são representados com a média \pm desvio-padrão.

Os dados foram analisados utilizando o *software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, EUA)*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Para o cálculo do IC50 foi feita uma regressão não-linear e traçada uma curva sigmoidal de dose-resposta, tendo sido analisados 3 ensaios MTS independentes com 3 réplicas em cada ensaio. Para analisar os dados morte e ciclo celular com 3 e 4 ensaios independentes, respectivamente, foi utilizado o teste não paramétrico *t-Student* de Mann-Whitney aplicado para duas amostras independentes. Para análise dos dados obtidos para os ensaios de viabilidade pelo método de azul de tripano, com 3 ensaios independentes e com 2 réplicas por ensaio, foi utilizado o teste paramétrico *two-way ANOVA* para comparar duas variáveis independentes, mas que apresentam uma relação entre si. Para analisar os dados de qRT-PCR foi utilizado o teste não paramétrico *t-Student* de Mann-Whitney aplicado para duas amostras independentes.

4. Resultados

4.1. Estudo do efeito do Palbociclib em células normais da tiróide e em linhas celulares de carcinomas da tiróide

O Palbociclib é um inibidor das CDK4/6, envolvidas na regulação dos *checkpoints* do ciclo celular, sendo por isso um composto frequentemente utilizado em casos com mutações ou alterações nos genes responsáveis por essa inibição (*CDKN2A* e *CDKN2B*) (Shmidt e Ehab).

Neste trabalho, foi testado o efeito do Palbociclib em linhas celulares de ATC (C643, T238, T235), PTC (BCPAP) com e sem mutações em genes que codificam CDKI e em células normais de tiróide (PCCL3). A linha C643 apresenta deleção dos genes *CDKN2A* e *CDKN2B* e a linha T238 apresenta mutação no gene *CDKN2A* (Tabela III). As linhas T235 e BCPAP e as células PCCL3 não apresentam mutações nestes genes.

4.1.1. Determinação do IC50 do Palbociclib em linhas celulares de ATC

A fim de determinar o IC50 (concentração do composto para a qual se observa 50 % da inibição da viabilidade celular) para o Palbociclib recorremos a ensaios MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] que medem a viabilidade metabólica celular. Foram utilizadas numa primeira etapa do trabalho as linhas celulares de ATC (C643, T238 e T235). Nestes ensaios foi determinada a curva dose-resposta deste composto para cada linha celular e o respectivo IC50.

Após 48 horas de exposição ao composto. Nas 3 linhas celulares de ATC usadas foi observado o efeito dose-resposta, isto é, uma diminuição da viabilidade celular metabólica com o aumento da concentração do composto (Figura 14). Contudo observaram-se diferentes IC50 para cada linha celular (Figura 15). Na linha T235, com a concentração de 17,5 µM, a dose mais alta testada nas outras duas linhas, não foi possível determinar a concentração que inibisse 50% do crescimento celular. Deste modo, para esta linha foram realizados ensaios MTS até uma concentração de 25 µM de Palbociclib (Figura 14).

Estes ensaios mostraram diferenças entre os IC₅₀ das três linhas celulares, revelando valores inferiores para as linhas celulares que apresentavam mutações nos genes alvo referidos. Nas linhas celulares com mutações (C643 e T238) a concentração letal para 50 % das células em cultura foi 14,64 μ M e 19,04 μ M, respectivamente, e na linha celular sem mutação (T235) foi 20,72 μ M.

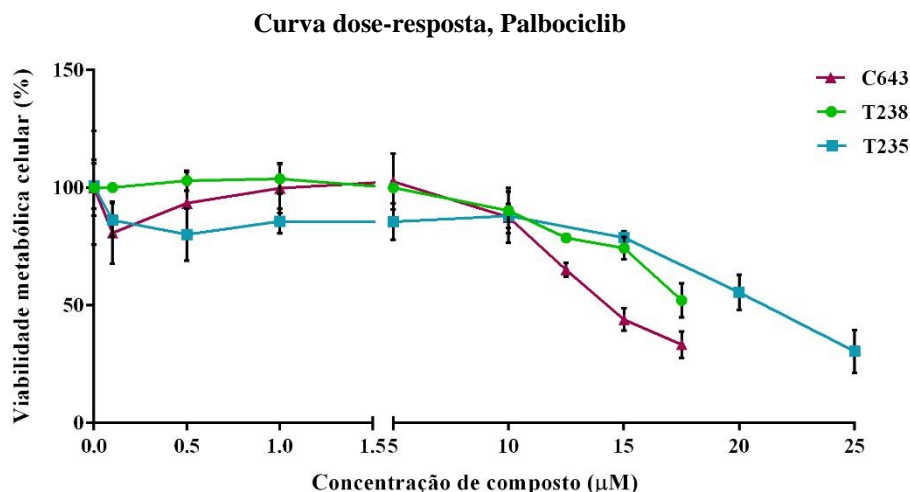


Figura 14 – Curvas dose-resposta obtidas através de 3 ensaios MTS independentes realizados para as três linhas celulares com diferentes concentrações de Palbociclib: 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15 e 20 μ M e até 25 μ M para a linha T235.

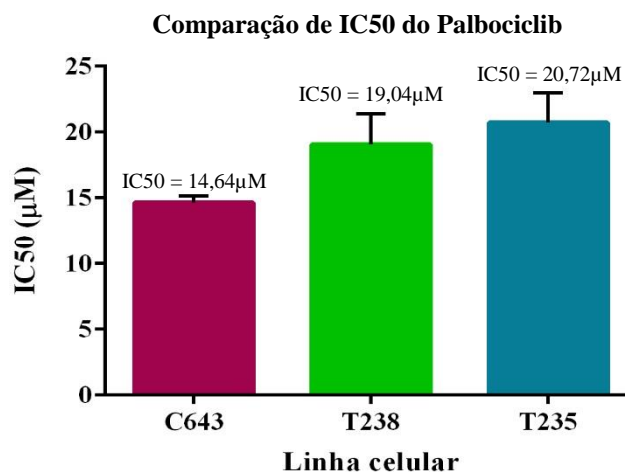


Figura 15 – Gráfico representativo da concentração que diminuiu em 50 % a viabilidade celular (IC₅₀), para as três linhas celulares, após 48 h em cultura com o Palbociclib. Concentrações de Palbociclib usadas nos 3 ensaios de MTS, realizados em triplicado: 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15; 20; 25 μ M.

4.1.2. Efeito do Palbociclib no ciclo, morte e viabilidade celular em linhas de ATC

Posteriormente, avaliou-se o efeito do Palbociclib no ciclo, morte e viabilidade das células de ATC. Nestes ensaios usaram-se concentrações inferiores aos IC50 de forma a avaliar o mecanismo subjacente à exposição do composto sem obter uma inibição elevada da viabilidade.

Relativamente aos ensaios de ciclo celular, na linha celular C643 observou-se que a presença de Palbociclib levou um aumento gradual da percentagem de células na fase G0/G1 do ciclo celular, relativamente ao controlo, com concentrações entre 0,1 e 5 μ M. Observou-se que o composto aumentou a percentagem de células em G0/G1 em aproximadamente 25 % e diminuiu as fases S e G2/M (~14 e 9 %, respectivamente). Enquanto que no controlo a percentagem de células em G0/G1 foi aproximadamente 69 % das células com 5 μ M de Palbociclib essa percentagem subiu para cerca de 95 % (Figura 16, A). Contudo com o aumento da concentração, superiores 5 μ M, a percentagem das células nas fases G0/G1 diminuiu gradualmente levando ao aumento da fase G2/M (Figura 16, A e C). Estes resultados podem indicar que as concentrações baixas de Palbociclib induzam uma paragem do ciclo na fase G0/G1 enquanto as concentrações elevadas do composto podem levar a uma paragem no ciclo celular na fase G2/M. Com concentrações superiores, 10 e 15 μ M de Palbociclib, foi possível observar um aumento da morte celular sem significado estatístico, que poderá resultar da elevada toxicidade a concentrações mais elevadas. A percentagem de morte celular aumentou de forma mais marcada com 15 μ M de Palbociclib. (Figura 16, B e D).

4. Resultados

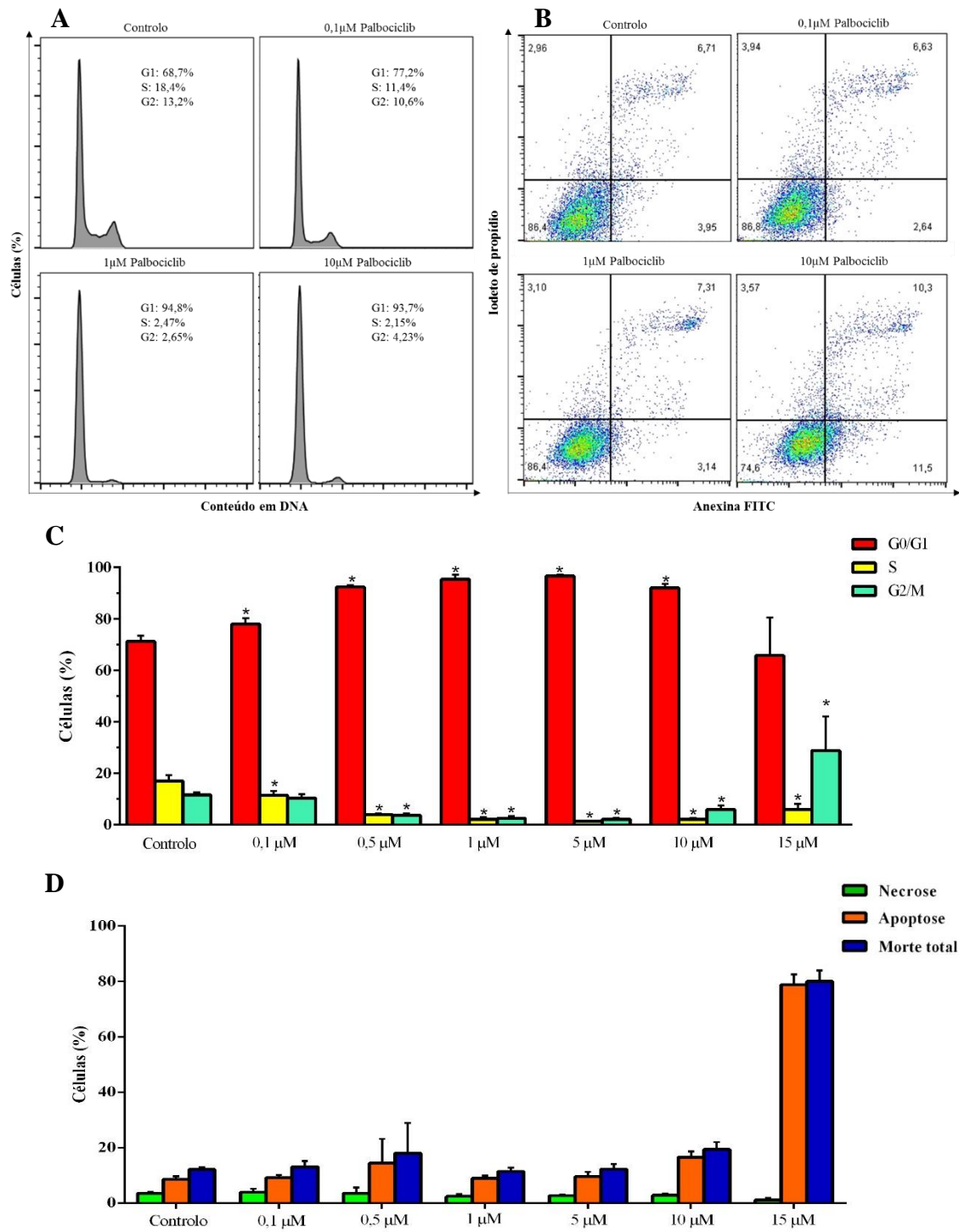


Figura 16 – Gráficos representativos dos resultados dos ensaios de ciclo e morte celular realizados para a linha celular C643 com diferentes concentrações de Palbociclib (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15; 20; 25 μ M). **A e B.** Gráficos de ciclo e morte celular, respectivamente, obtidos pela leitura das amostras no citómetro de fluxo e representativos de um ensaio. **C e D.** Resultados de 4 e 3 ensaios (realizados em duplicado) de ciclo e morte celular, respectivamente, após 48 h de incubação com Palbociclib. *, $p < 0,05$.

Seguidamente, para investigar se o aumento da proporção de células na fase G0/G1 estaria associado com uma redução da proliferação celular realizaram-se ensaios de viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de tripano ao longo de 72 horas. Com este ensaio foi possível avaliar se o número de células viáveis aumentava ao longo do tempo (24 h, 48 h e 72 h), e desta forma, inferir se as células estariam a proliferar. Para tal utilizou-se a concentração de Palbociclib mais baixa para a qual se observou um efeito próximo do máximo na fase G0/G1 nos ensaios de ciclo celular. Com estes dados foi possível observar, na figura 17, uma diminuição da viabilidade celular relativamente ao controlo ao longo do tempo, sendo essas diferenças estatisticamente significativas.

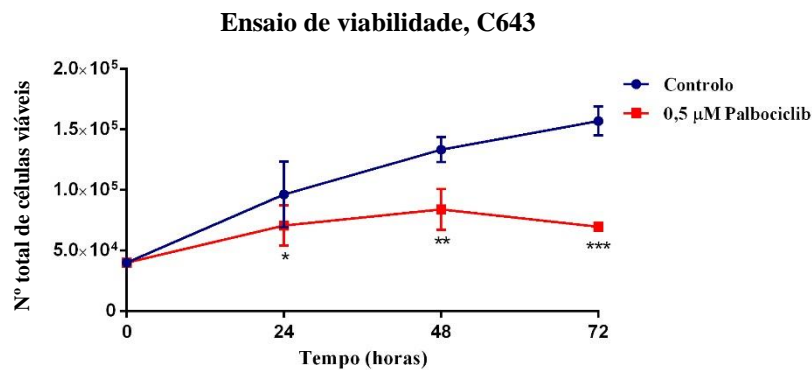


Figura 17 – Resultados dos 3 ensaios de viabilidade celular independentes obtidos às 24 h, 48 h e 72 h, após incubação da linha celular C643 com 0,5 μM de Palbociclib. *, $p < 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.

Relativamente à linha celular T238, com a mutação no gene *CDKN2A* que afecta apenas a proteína p16^{ARF}, observou-se uma resposta semelhante à da linha C643. Contudo esta linha celular de ATC mostrou-se menos sensível ao Palbociclib apresentando um IC50 superior. Observou-se também um aumento gradual da percentagem de células em fase G0/G1 do ciclo celular, relativamente ao controlo, com concentrações de Palbociclib entre 0,1 e 1 μM , e a partir de 5 μM o aumento relativo foi baixando gradualmente. O aumento máximo observado foi de aproximadamente 20 %, obtido com a concentração de 1 μM , sendo que no controlo se observou cerca de 61 % de células na fase G0/G1 e com Palbociclib essa percentagem subiu para cerca de 82 % (Figura 18, A e C). Tal como já foi referido para a linha C643, a diminuição observada a partir de 5 μM poderá ser justificada pelo facto de se observar um aumento da morte celular, relativamente ao controlo, com concentrações de Palbociclib $\geq 5 \mu\text{M}$ (Figura 18, B e D).

4. Resultados

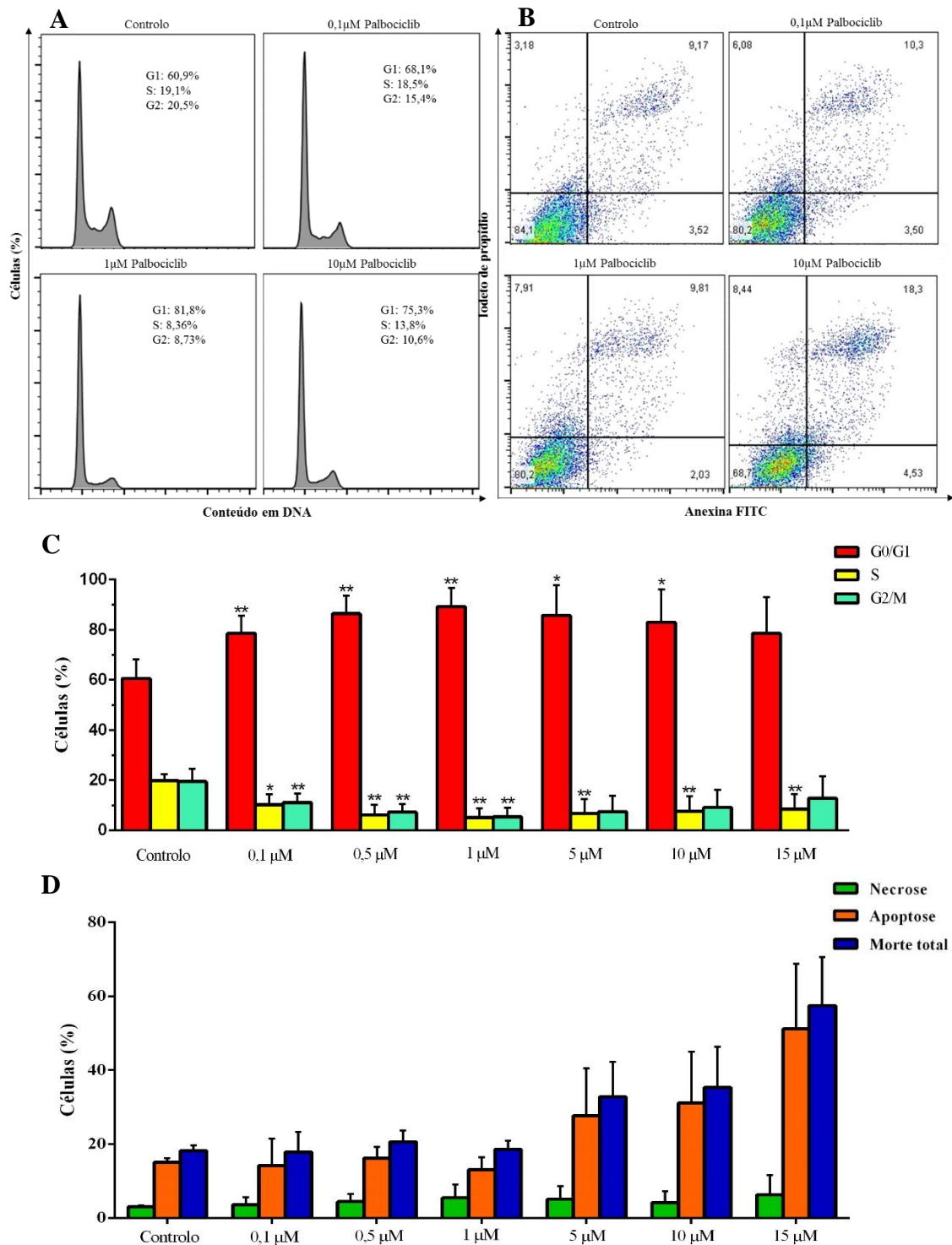


Figura 18 – Gráficos representativos dos resultados dos ensaios de ciclo e morte celular realizados para a linha celular T238 com diferentes concentrações de Palbociclib (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15; 20; 25 μ M). **A e B.** Gráficos de ciclo e morte celular, respectivamente, obtidos pela leitura das amostras no citómetro de fluxo e representativos de um ensaio. **C e D.** Resultados de 4 e 3 ensaios (realizados em duplicado) de ciclo e morte celular, respectivamente, após 48 h de incubação com Palbociclib. *, $p < 0,05$; **, $p \leq 0,01$.

Relativamente à linha celular T238, como é possível observar na figura 19, houve diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular relativamente ao controlo nos *time-points* 48 e 72 h.

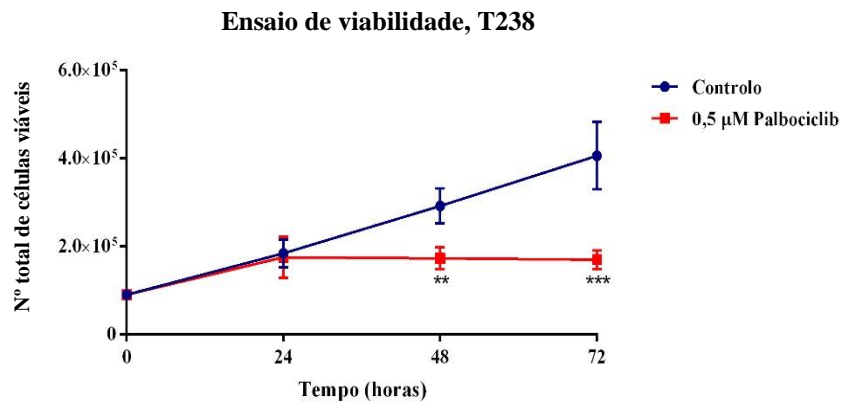


Figura 19 – Resultados dos 3 ensaios de viabilidade celular independentes obtidos às 24 h, 48 h e 72 h, após incubação da linha celular T238 com 0,5 μM de Palbociclib. **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.

Nos ensaios de ciclo celular com a linha celular T235 observou-se também um aumento gradual da percentagem de células em fase G0/G1 do ciclo celular, relativamente ao controlo, com concentrações de Palbociclib entre 0,1 e 0,5 μM , e a partir de 1 μM o aumento relativo baixou gradualmente. O aumento máximo observado foi de aproximadamente 15 %, obtido com a concentração de 0.5 μM , sendo que no controlo se observou cerca de 75 % de células em fase G0/G1 e com o Palbociclib essa percentagem subiu para cerca de 89 % (Figura 20, A e C). No entanto, este aumento foi inferior ao observado nas linhas celulares C643 e T238.

Quanto à morte celular, observou-se que esta linha celular apresentava uma maior percentagem de morte total, mesmo no controlo, comparativamente com as linhas celulares C643 e T238. Nestes ensaios, apenas com 15 μM de Palbociclib houve um ligeiro aumento da morte celular (Figura 20, B e D).

4. Resultados

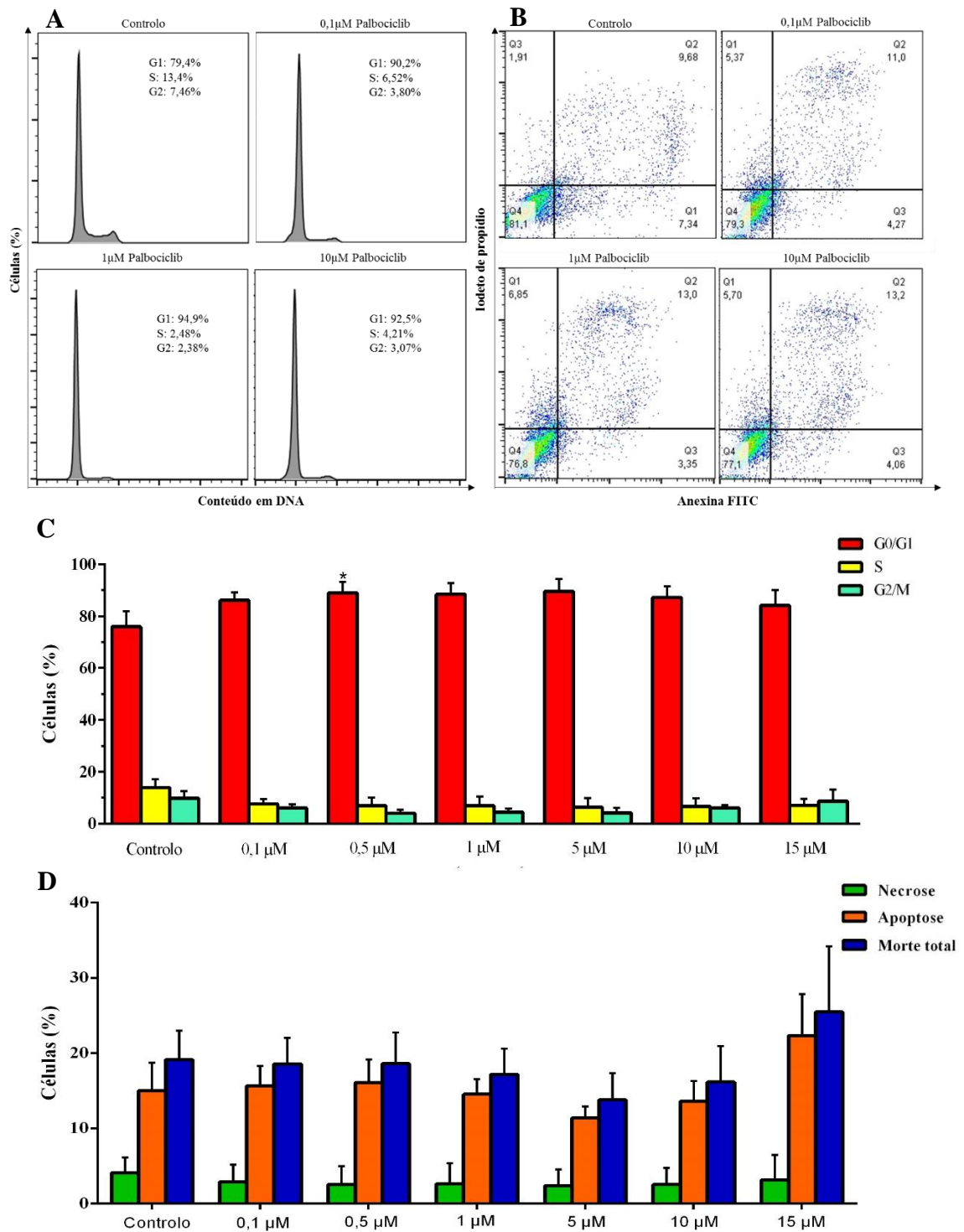


Figura 20 – Gráficos representativos dos resultados dos ensaios de ciclo e morte celular realizados para a linha celular T235 com diferentes concentrações de Palbociclib (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15; 20; 25 μ M). **A e B**. Gráficos de ciclo e morte celular, respectivamente, obtidos pela leitura das amostras no citómetro de fluxo e representativos de um ensaio. **C e D**. Resultados de 4 e 3 ensaios (realizados em duplicado) de ciclo e morte celular, respectivamente, após 48 h de incubação com Palbociclib. *, $p < 0,05$.

Como é possível observar na figura 21, na linha T235 também houve diminuição estatisticamente significativa do número total de células viáveis ao longo do tempo quando comparado com a condição não tratada.

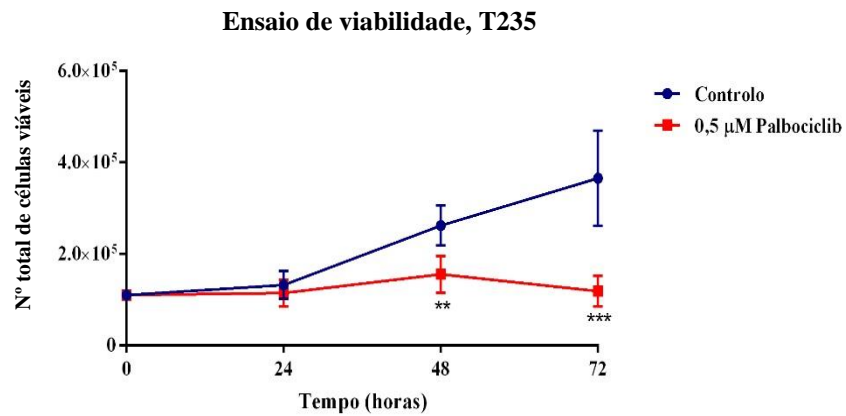


Figura 21 – Resultados dos 3 ensaios de viabilidade celular independentes obtidos às 24 h, 48 h e 72 h, após incubação da linha celular T235 com 0,5 μM de Palbociclib. **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.

4.1.3. Estudo do efeito do Palbociclib na viabilidade celular – numa linha celular de PTC

Os resultados obtidos nos ensaios de ciclo e viabilidade celular com as linhas celulares de ATC (C643, T238 e T235) mostraram que todas estas linhas apresentavam uma resposta ao Palbociclib. Para avaliar se o efeito observado poderia estar relacionado com outras alterações da expressão e/ou função dos genes envolvidos na regulação do ciclo celular (não detectáveis por análise mutacional), especificamente em ATC, optou por se testar este composto numa linha celular diferente. Assim, utilizou-se a linha celular BCPAP, de carcinoma papilar da tiróide.

Para avaliar de uma forma mais imediata o efeito do Palbociclib nesta linha celular, realizaram-se primeiramente ensaios de viabilidade celular com uma concentração de Palbociclib igual à que tinha sido utilizada nas 3 linhas de ATC. Para tal, os ensaios de viabilidade foram realizados ao longo do tempo (24 h, 48 h e 72 h) com 0,5 μ M de Palbociclib. À semelhança do que foi observado para as linhas celulares de ATC, a linha celular BCPAP apresentou também uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular relativamente ao controlo nos *time-points* 48 e 72 h (Figura 22). No entanto, apesar de se observar uma diferença entre a condição tratada e o controlo, na linha BCPAP observou-se também um aumento do número total de células viáveis na condição tratada contrariamente ao que se observou nas linhas celulares de ATC, nas quais a partir das 24 h, a viabilidade celular das células tratadas não se alterava sugerindo uma paragem da divisão celular, mantendo-se constante o número total de células de viáveis em cultura (Figuras 17, 19 e 21).

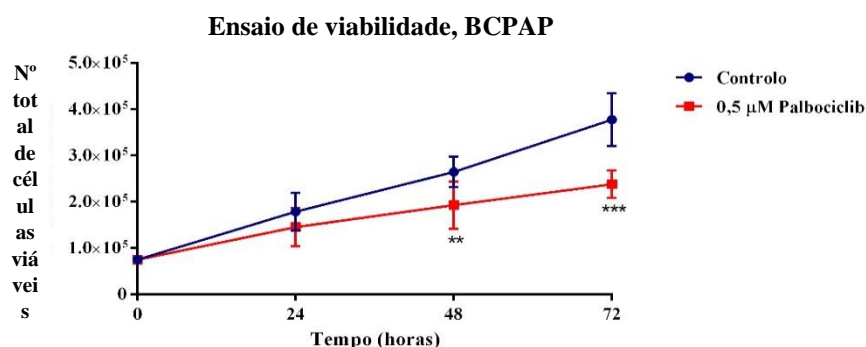


Figura 22 – Resultados dos ensaios de viabilidade celular independentes obtidos às 24 h, 48 h e 72 h, após incubação da linha celular BCPAP com 0,5 μ M de Palbociclib. **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.

4.1.4. Estudo do efeito do Palbociclib na viabilidade celular - células normais de tiroide

Tendo em conta os resultados obtidos com as 3 linhas de carcinomas indiferenciados e a linha celular de carcinoma bem diferenciado da tiróide, para avaliar a especificidade dos efeitos observados, testou-se o Palbociclib em células foliculares de tiróide normal de *Rattus norvegicus* (PCCL3). Desta forma, realizou-se o ensaio de azul de tripano com as células foliculares PCCL3. Para tal, os ensaios de viabilidade também foram realizados ao longo do tempo (24 h, 48 h e 72 h) com 0,5 μ M de Palbociclib.

Contrariamente ao que foi observado nas linhas celulares referidas anteriormente, as células PCCL3 não apresentaram uma resposta ao Palbociclib. Ao longo do tempo não se observou diferenças significativas da condição tratada quando em comparação com o controlo (Figura 23).

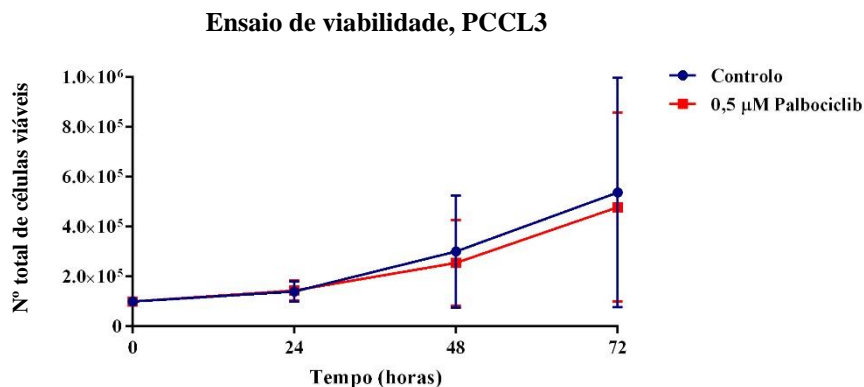


Figura 23 – Resultados dos 3 ensaios de viabilidade celular independentes obtidos às 24 h, 48 h e 72 h, após incubação das células PCCL3 com 0,5 μ M de Palbociclib.

4.2. Estudo do efeito do Tipifarnib em linhas celulares de carcinomas anaplásicos da tiróide

O Tipifarnib é um inibidor do enzima farnesil transferase, que actua na via MAPK-ERK e impede a activação da isoforma *HRAS*, que quando mutada permanece constitutivamente activa. Este composto poderá, potencialmente, ser utilizado como terapêutica, nos casos que apresentem mutações no gene *HRAS*.

Neste trabalho, foi testado o efeito do Tipifarnib em linhas celulares de ATC com e sem mutação no gene *HRAS*. A linha C643 apresenta mutação neste gene e as linhas T238 e T235 não apresentam mutação.

4.2.1. Determinação do IC50 do Tipifarnib em linhas celulares de ATC

Também para o Tipifarnib, recorreu-se a ensaios MTS para determinar o IC50 desse composto para as 3 linhas celulares de ATC C643, T238 e T235 e determinar a curva dose-resposta para cada linha.

Os ensaios de viabilidade mostraram que o aumento das concentrações de Tipifarnib foi levando progressivamente à redução da viabilidade celular metabólica das 3 linhas testadas (Figura 24). No entanto observaram-se diferentes IC50 para cada linha celular (Figura 25), sendo que o IC50 menor foi obtido par a linha celular (C643) que apresenta mutação no gene alvo deste composto (*HRAS*). Nessa linha, o IC50 foi 15,19 μ M e para as linhas T238 e T235 foi 20,23 e 20,85 μ M, respectivamente.

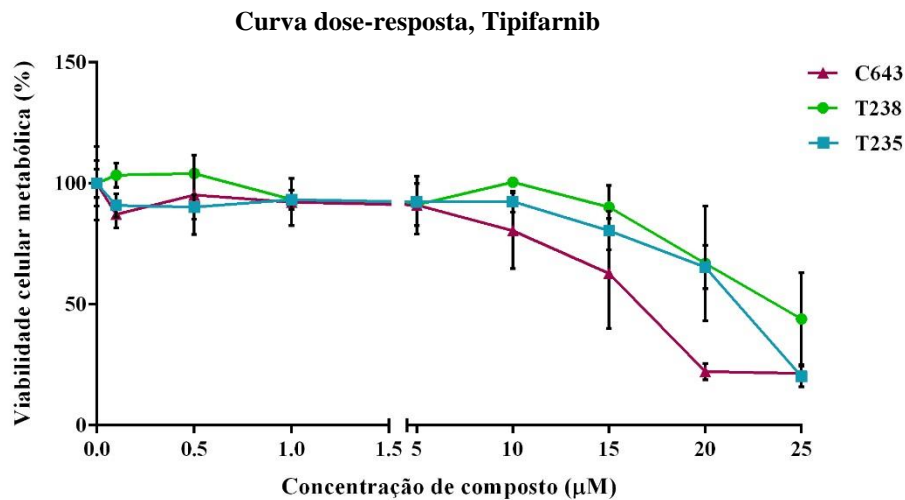


Figura 24 – Curvas dose-resposta obtidas através de 3 ensaios MTS independentes realizados para as três linhas celulares com diferentes concentrações de Tipifarnib: 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15; 20 e 25 µM.

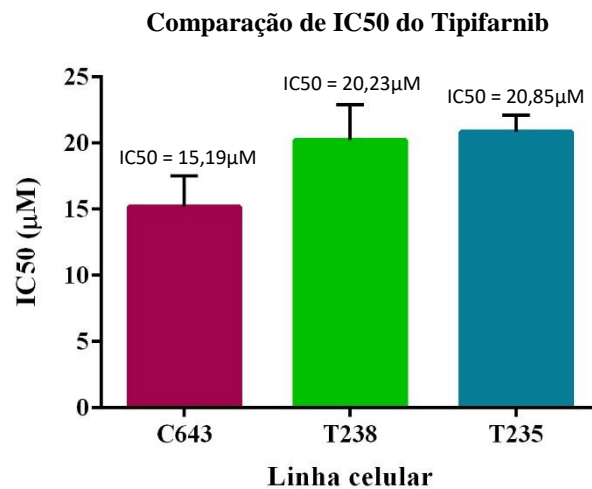


Figura 25 – Gráfico representativo da concentração que diminuiu em 50 % a viabilidade celular (IC₅₀), para as três linhas celulares, após 48 h em cultura com o Tipifarnib. Concentrações de Tipifarnib usadas nos 3 ensaios de MTS realizados em triplicado: 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15; 20; 25 µM.

4.2.2. Efeito do Tipifarnib no ciclo, morte e viabilidade celular em linhas de ATC

Após os ensaios MTS, estudou-se o efeito do Tipifarnib também nos ensaios de ciclo, morte e viabilidade nas três linhas de ATC. Novamente, as concentrações de composto usadas nestes ensaios foram inferiores aos IC50.

Quanto aos ensaios de ciclo celular referentes à linha celular C643 pôde observar-se que na presença de Tipifarnib houve um aumento da percentagem de células na fase G2/M do ciclo celular (acompanhado pela diminuição dessa percentagem para a fase G0/G1), relativamente ao controlo.

O aumento máximo observado para a percentagem de células na fase G2/M foi de aproximadamente 39 %, sendo que neste ensaio no controlo se observou cerca de 11 % de células em G2/M e com 0,1 μ M de Tipifarnib (concentração mais baixa testada com maior efeito do composto) essa percentagem subiu para cerca de 50 % (Figura 26, A). A proporção de células na fase G2/M diminuiu gradualmente com concentrações acima de 0,1 μ M, mantendo-se no entanto superior ao controlo até aos 5 μ M. A partir da concentração de 10 μ M observou-se o aumento significativo da percentagem de células na fase G0/G1.

A percentagem de células na fase S não teve alterações relevantes nas diferentes concentrações de Tipifarnib testadas (Figura 26, A e C).

Dado que a concentração mais baixa de Tipifarnib testada, 0,1 μ M, correspondeu ao efeito máximo observado para este composto nos ensaios de ciclo celular, foi subsequentemente testada uma nova concentração, inferior. Realizaram-se ensaios de ciclo celular com 0,01 μ M de Tipifarnib. No entanto, estes resultados mostraram que, apesar de haver aumento da percentagem de células em fase G2/M com 0,01 μ M (~ 20 %), esse aumento foi inferior ao que tinha sido observado com 0,1 μ M (~ 40 %) (Figura 26).

Relativamente à morte celular, com concentrações superiores a 10 μ M de Tipifarnib, observou-se um aumento da morte celular em relação à condição não tratada, apesar de não significativo (Figura 26, B e D). Com 15 μ M de Tipifarnib, quase 100 % das células encontravam-se em morte celular (Figura 26, D), não sendo recolhidas células suficientes para adquirir nos ensaios de ciclo celular.

4. Resultados

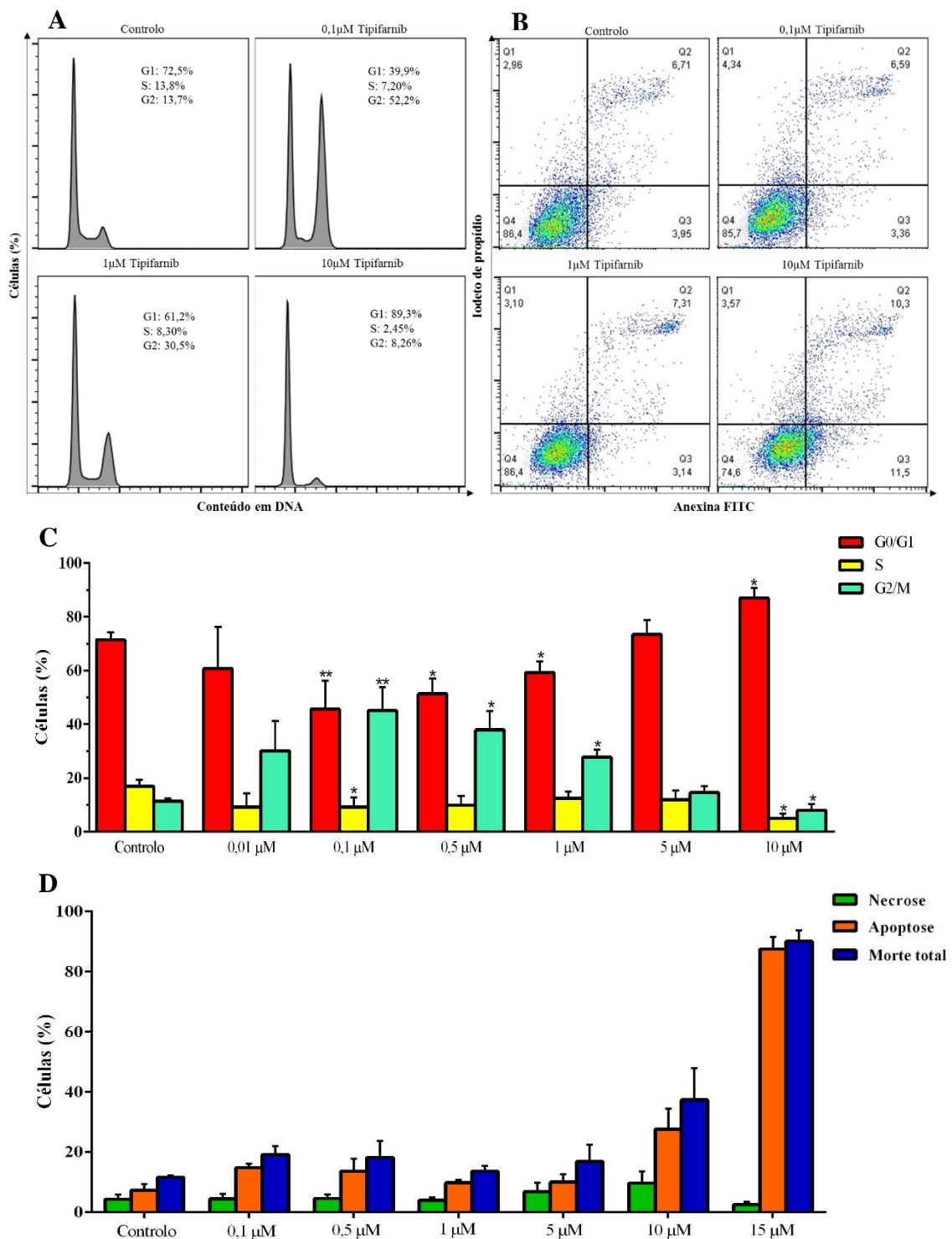


Figura 26 – Gráficos representativos dos resultados dos ensaios de ciclo e morte celular realizados para a linha celular C643 com diferentes concentrações de Tipifarnib (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15; 20; 25 µM). A concentração de 0,01 µM foi apenas testada nos ensaios de ciclo celular. **A e B.** Gráficos de ciclo e morte celular, respectivamente, obtidos pela leitura das amostras no citômetro de fluxo e representativos de um ensaio. **C e D.** Resultados de 4 e 3 ensaios de ciclo e morte celular (realizados em duplicado), respectivamente, obtidos após 48h de incubação com Tipifarnib. *, $p < 0,05$.

Em seguida, para investigar se o aumento da percentagem de células na fase G2/M correspondia à paragem do ciclo celular nessa fase e consequentemente à diminuição da proliferação celular, em resposta ao Tipifarnib, realizaram-se ensaios de viabilidade celular ao longo do tempo (24 h, 48 h e 72 h). Nestes ensaios foi utilizada a concentração mais baixa de Tipifarnib (0,1 μ M). Como é possível observar na figura 27, houve diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular ao longo tempo relativamente ao controlo, o que sugere que houve uma diminuição da proliferação celular a partir das 24h com Tipifarnib, estando assim de acordo com a hipótese colocada da paragem do ciclo celular na fase G2/M.

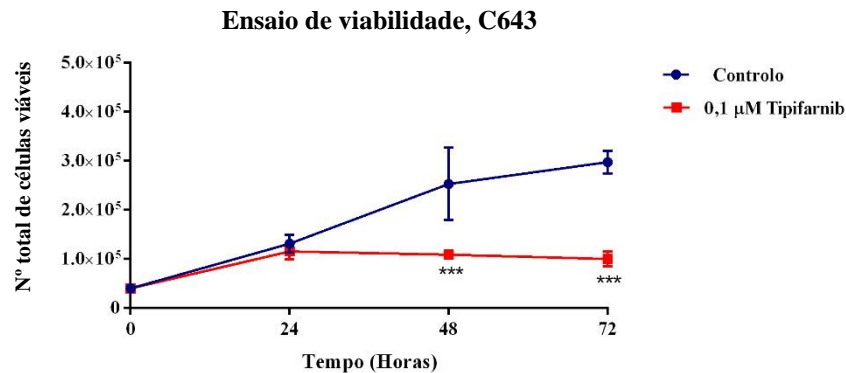


Figura 27 – Resultados dos 3 ensaios de viabilidade celular independentes obtidos às 24 h, 48 h e 72 h após incubação da linha celular C643 com 0,1 μ M de Tipifarnib. ***, $p \leq 0,001$.

Relativamente aos ensaios de ciclo e morte celular referentes à linha celular T238, com diferentes concentrações de Tipifarnib, não se observaram diferenças relativamente ao controlo, excepto com a concentração mais elevada testada (Figura 28, A, B, C e D). Com 15 μ M de Tipifarnib, observou-se um aumento da percentagem de células na fase G2/M de cerca de 18 % e diminuição na fase G0/G1 (~25 %) (Figura 28, C). Estas diferenças na resposta celular poderão estar relacionadas com o marcado aumento da morte celular que se observou com 15 μ M de Tipifarnib (Figura 28, D).

4. Resultados

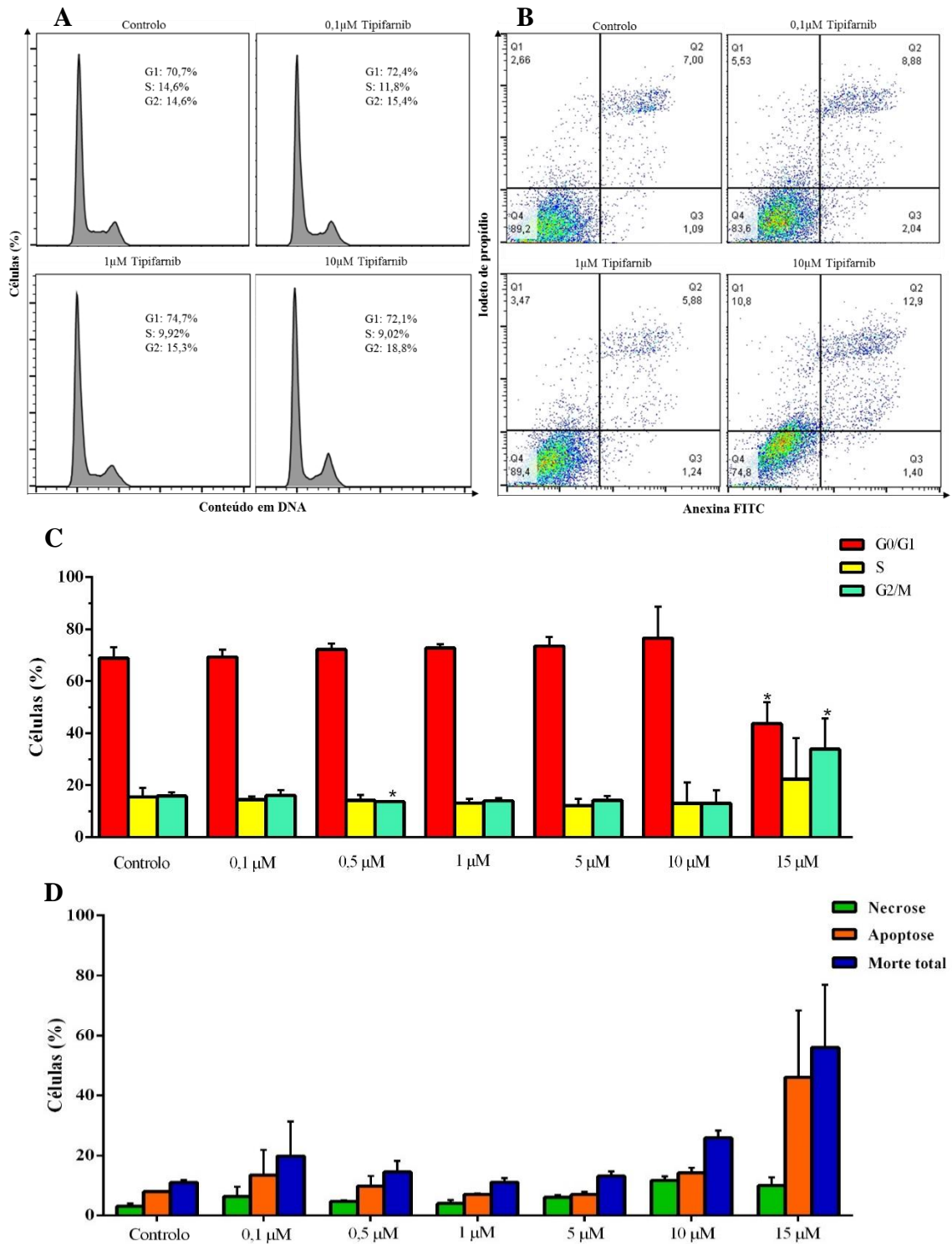


Figura 28 – Gráficos representativos dos resultados dos ensaios de ciclo e morte celular realizados para a linha celular T238 com diferentes concentrações de Tipifarnib (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15; 20; 25 μ M). **A e B**. Gráficos de ciclo e morte celular, respectivamente, obtidos pela leitura das amostras no citómetro de fluxo e representativos de um ensaio. **C e D**. Resultados de 4 e 3 ensaios (realizados em duplicado) de ciclo e morte celular, respectivamente, obtidos em duplicado após 48 h de incubação com Tipifarnib. *, $p < 0,05$.

Com esta linha celular, realizaram-se também ensaios de viabilidade pelo método de exclusão do azul de tripano. Nestes ensaios foi utilizada a concentração mais baixa de Tipifarnib para a qual se observou um efeito máximo nos ensaios de ciclo celular na fase G2/M com a linha celular C643. Como é possível observar na figura 29, não se observaram diferenças estatisticamente significativas no número total de células viáveis ao longo do tempo relativamente ao controlo.

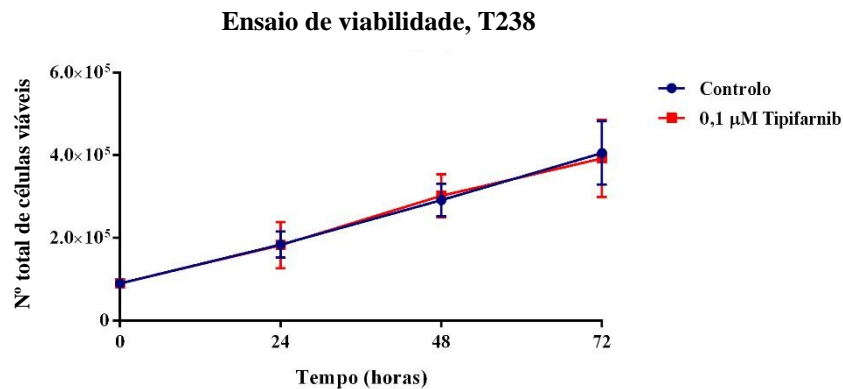


Figura 29 – Resultados dos 3 ensaios de viabilidade celular independentes obtidos às 24 h, 48 h e 72 h, após incubação da linha celular T238 com 0,1 μM de Tipifarnib.

Analogamente, para a linha celular T235, com as diferentes concentrações de Tipifarnib testadas, não se observaram diferenças relativamente ao controlo, excepto com a concentração de 10 μ M (Figura 30, A e C). Com esta concentração observou-se uma diminuição da percentagem de células em fase G0/G1 e um aumento de ~10 % de células na fases G2/M ($p < 0,05$) (Figura 30, A). Com 15 μ M de Tipifarnib observou-se um ligeiro aumento da percentagem de células na fase G0/G1, que poderá estar relacionado com o aumento da morte celular (sem significado estatístico) (Figura 30, B e D). Com as restantes concentrações de Tipifarnib, não se observaram diferenças relevantes na morte celular, em relação ao controlo (Figura 30, D).

4. Resultados

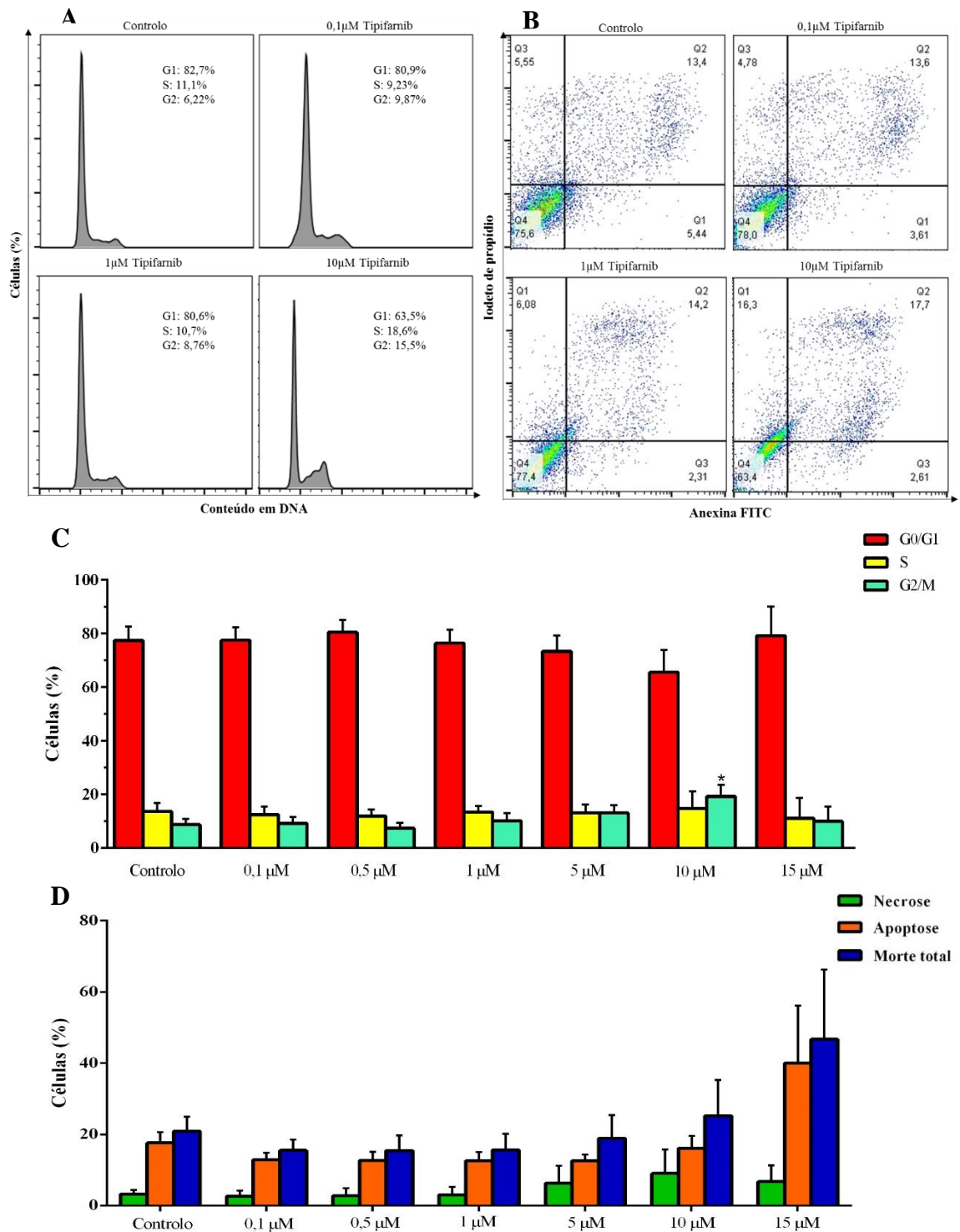


Figura 30 – Gráficos representativos dos resultados dos ensaios de ciclo e morte celular realizados para a linha celular T235 com diferentes concentrações de Tipifarnib (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15; 20; 25 μ M). **A e B.** Gráficos de ciclo e morte celular, respectivamente, obtidos pela leitura das amostras no citômetro de fluxo e representativos de um ensaio. **C e D.** Resultados de 4 e 3 ensaios (realizados em duplicado) de ciclo e morte celular, respectivamente, obtidos em duplicado após 48 h de incubação com Tipifarnib. *, $p < 0,05$.

Também para esta linha realizaram-se ensaios de viabilidade celular, utilizando 0,1 μM de Tipifarnib. De igual modo, não se observaram diferenças estatisticamente significativas na viabilidade celular relativamente à condição não tratada, nos três *time-points* estudados (24 h, 48 h e 72 h) (Figura 31).

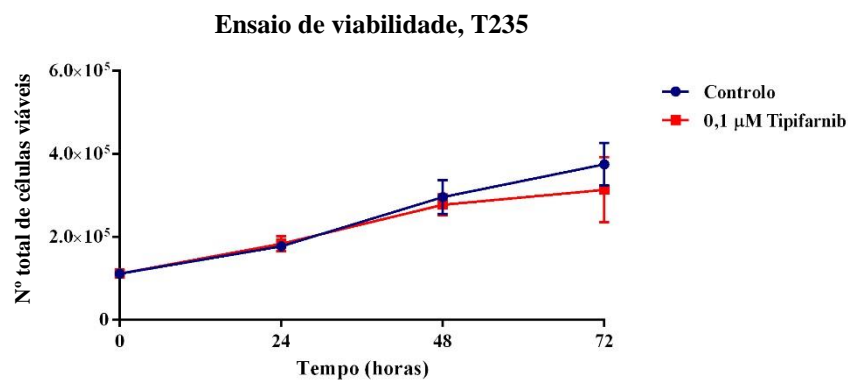


Figura 31 – Resultados dos 3 ensaios de viabilidade celular independentes obtidos às 24 h, 48 h e 72 h, após incubação da linha celular T235 com 0,1 μM de Tipifarnib.

4.3. Análise da expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular

Para investigar qual o efeito do composto Tipifarnib na expressão de genes que regulam o ciclo celular procedeu-se à realização de ensaios de qRT-PCR para quantificar a expressão de genes que codificam proteínas que regulam os *checkpoints* G1/S (*CDK4*, *CDK6* e *CCND1*) e S e G2/M (*CCNB1*, *CDK1*, *CCNA2* e *CDK2*) do ciclo celular.

Como é possível ver na figura 32.B, os níveis de expressão dos genes *CDK4* e *CDK6*, envolvidos na fase G1/S do ciclo celular, mantiveram-se semelhantes com e sem tratamento com Tipifarnib, nas três linhas celulares. No entanto, o gene *CCND1*, que codifica a ciclina D1, apresentou menor expressão nas células C643 tratadas com Tipifarnib, não sendo no entanto esta diferença estatisticamente significativa. Por outro lado, com o Tipifarnib, os genes *CDK1*, *CCNA2* e *CDK2*, envolvidos na regulação da progressão da fase S para a fase G2/M e no checkpoint G2/M do ciclo celular, apresentaram uma tendência no aumento de expressão (em relação ao controlo) muito superior na linha C643, comparando com as restantes linhas, (Figura 32.A), não sendo no entanto esta diferença estatisticamente significativa. O gene *CCNB1*, envolvido no *checkpoint* G2/M não apresentou diferenças de expressão relevantes, com e sem tratamento com o Tipifarnib, nas 3 linhas celulares estudadas.

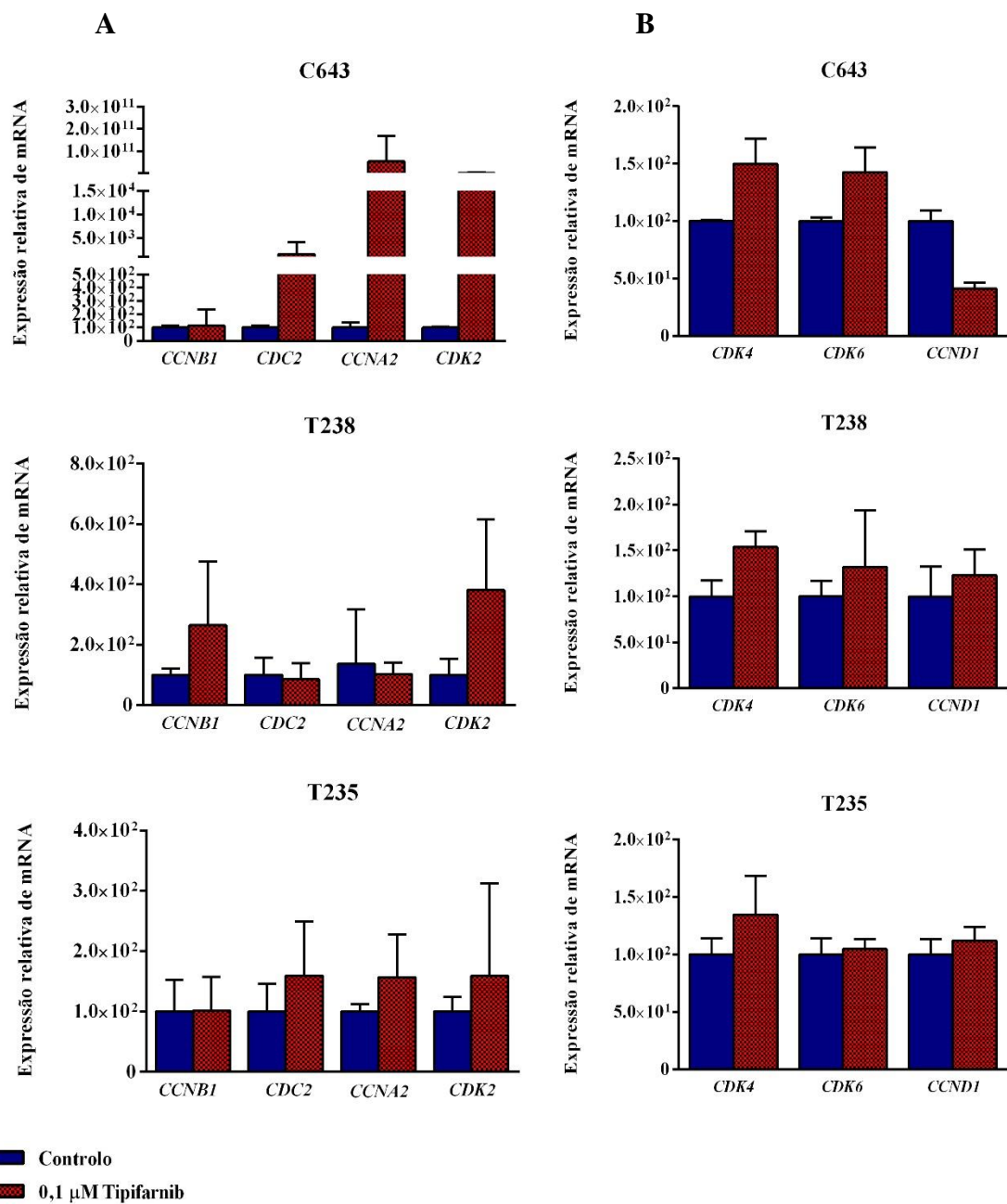


Figura 32 – Resultados dos ensaios de qRT-PCR obtidos a partir de RNA extraído das linhas celulares C643, T238 e T235, após incubação com 0,1 μM de Tipifarnib durante 48 h. **A e B.** Análise da expressão de genes envolvidos na fase G2/M e G1/S do ciclo celular, respectivamente.

5. Discussão

Os ATC são tumores da tiróide muito agressivos, com uma taxa de mortalidade próxima de 100% (27). As terapêuticas convencionais não são satisfatórias no combate à progressão dos tumores avançados da tiróide, sendo importante desenvolver novas terapêuticas que tenham impacto na sobrevivência dos doentes (35). Uma nova geração de fármacos tem sido estudada como terapêutica dirigida (*targeted therapy*) de forma a interferir directamente com um alvo molecular específico, que desempenhe um papel essencial no crescimento e progressão do tumor. A identificação desses alvos moleculares implica um conhecimento detalhado das alterações moleculares de cada tipo de tumor (76).

O objectivo principal deste projecto foi identificar possíveis novas terapêuticas direccionadas para alvos moleculares específicos envolvidos no desenvolvimento de ATC.

Em estudos anteriores, o nosso grupo mostrou que os genes *TP53*, *RAS*, *CDKN2A* e *CDKN2B* e vias de sinalização relacionadas, se encontravam frequentemente alterados em ATC (29, 77), representando importantes alvos moleculares para o tratamento deste tipo de tumores. Deste modo, este trabalho teve como principal objetivo testar novos compostos direccionados para alguns destes alvos.

Para este projecto, foram seleccionadas três linhas celulares de ATC: C643, T238 e T235. A linha C643 apresenta mutações nos genes *TP53*, *HRAS* e deleção dos genes *CDKN2A* e *CDKN2B* que afectam os transcritos p14^{ARF}/p16^{INK4A} e p15^{INK4B}, respectivamente. A linha T238 apresenta mutações nos genes *TP53*, *CDKN2A* (afectando apenas o transcrito p16^{INK4A}), *BRAF* e *PIK3CA*. Por outro lado, a linha T235 apenas apresenta mutação no gene *BRAF* (29). Foi também utilizada, neste estudo, uma linha de carcinoma papilar da tiróide (BCPAP) e células normais da tiróide (PCCL3). A linha BCPAP apresenta mutações nos genes *BRAF* e *TP53* e as células PCCL3 não apresentam mutações.

As três linhas celulares de ATC foram usadas para testar o efeito do Tipifarnib, inibidor da farnesilação do *HRAS* mutado (18, 78), na viabilidade e no ciclo celular, neste tipo de tumor. As mesmas três linhas de ATC, em conjunto com a linha BCPAP e as

células PCCL3, foram usadas para testar o efeito do Palbociclib, enquanto inibidor das CDK4/6 (62), na viabilidade e no ciclo celular.

5.1. Estudo do Palbociclib

As curvas dose-resposta para o Palbociclib obtidas para as três linhas celulares de ATC mostraram que a citotoxicidade do composto era dependente da concentração utilizada.

Para o Palbociclib, os IC₅₀ das linhas C643, T238 e T235 foram 14,6, 19,0 e 20,7 μ M, respectivamente. De acordo com as alterações atrás descritas para estas linhas celulares, estes resultados sugeriram que os valores de IC₅₀ podiam estar relacionados com as alterações nos genes codificantes de CDKI presentes em cada uma. Deste modo, a linha C643, que apresenta deleção homozigótica dos genes *CDKN2A* e *CDKN2B* (29), sendo esperado que afectasse a expressão dos transcritos p14^{ARF}, p16^{INK4A} e p15^{INK4B}, apresentou o valor de IC₅₀ mais baixo. A linha T235, que não apresenta qualquer alteração nestes genes (29), apresentou o IC₅₀ mais elevado. A linha T238, que apresenta mutação heterozigótica no gene *CDKN2A*, afectando apenas a expressão da proteína p16^{INK4A} (29), apresentou um valor de IC₅₀ intermédio, comparando com as outras duas linhas.

Estes resultados indicaram que a linha C643 é mais sensível à acção deste composto, quando comparada com as restantes duas linhas celulares, sendo necessária uma concentração inferior de Palbociclib para produzir 50% da inibição da viabilidade celular. Sathe e seus colaboradores, em 2015, testaram concentrações de Palbociclib entre 10 e 2000 nM e também observaram alterações na sensibilidade a esse composto em diferentes linhas celulares de cancro da bexiga, observando maior sensibilidade nas linhas com o gene *CDKN2A* alterado e *RB1* *wt*, quando comparadas com linhas *wt* para o gene *CDKN2A* e com o gene *RB1* alterado (79). Também Teh e co-autores observaram diferenças no IC₅₀, com concentrações testadas entre 0,1 e 10 μ M de Palbociclib, entre diferentes linhas celulares de melanoma, que consistiram em menores níveis de sensibilidade em linhas com deleção do gene *RB1* do que em linhas com esse mesmo gene *wt*. Neste estudo, não foi encontrada uma correlação clara entre as mutações presentes no gene *CDKN2A* e a resposta ao Palbociclib (80). No entanto,

estes resultados sugeriram que o efeito do Palbociclib poderia estar relacionado com a presença de mutações no gene *RBI*, sendo que o efeito seria mais visível quando este gene se encontrava na sua forma *wt*.

Relativamente aos ensaios de ciclo e viabilidade celular, observou-se um aumento do número de células na fase G0/G1 do ciclo celular e uma redução significativa do número total de células viáveis, após tratamento com o Palbociclib, evidenciando a acção deste composto ao nível da regulação do ciclo celular.

A transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular requer a fosforilação da proteína Rb pelas CDK4/6 em conjunto com subunidades activadoras, as ciclinas do tipo D. Os CDKIs p14^{ARF}, p15^{INK4B} e p16^{INK4A} são inibidores específicos das referidas CDK, que através do bloqueio da fosforilação da proteína Rb, levam à paragem do ciclo celular na fase G1 (62), funcionando deste modo como supressores tumorais (10, 58).

Neste estudo, quando as linhas C643 e T238, que apresentam alterações de genes CDKI (responsáveis pela inibição das CDK4/6 e do ciclo celular), foram tratadas com 0,5 μ M de Palbociclib, observou-se um aumento de 20-25 % das células na fase G0/G1 e redução de cerca de 40 % do número de células viáveis, às 48 h. Estes resultados sugeriram que a acção do Palbociclib poderia, em parte, substituir a função dos CDKI nestas linhas celulares.

Por outro lado, a linha T235, embora não apresente mutações nos referidos genes que codificam CDKI, também apresentou uma resposta a este composto. Após tratamento com 0,5 μ M de Palbociclib, às 48h, observou-se um aumento de cerca de 13 % das células na fase G0/G1 e redução de cerca de 40 % do número de células viáveis.

Os resultados obtidos com a linha T235 sugeriram que o Palbociclib poderia potenciar a acção dos inibidores das CDK, em células que apresentassem alterações na regulação do ciclo celular. De acordo com esta hipótese, estudos anteriores de expressão génica global, realizados pelo nosso grupo, mostraram que o ciclo e a proliferação celular são funções predominantemente alteradas em ATCs (29), podendo assim justificar o efeito, embora menos pronunciado, também nesta linha.

Assim, para esclarecer se este efeito poderia ser exclusivo em linhas de ATC, uma vez que reúnem um conjunto de alterações moleculares relevantes para induzir a

progressão do ciclo celular, estudou-se também o efeito deste composto numa linha celular de carcinoma diferenciado da tiróide (BCPAP), e em células normais de tiróide (PCCL3), ambas sem alterações reportadas em genes que codificam CDKI.

Após tratamento com 0,5 μ M de Palbociclib, às 48h, observou-se uma redução de cerca de 27 % no número total de células viáveis na linha celular BCPAP.

Num estudo de Teh e seus colaboradores, realizado em 2016, uma linha celular de melanoma com *BRAF* mutado e deleção do gene *RBI*, mas sem mutação no gene *CDKN2A* mostrou menor sensibilidade ao Palbociclib, quando comparada com outra linha com os genes *RBI* e *CDKN2A* *wt*, sugerindo que a integridade funcional da proteína Rb é importante para a acção deste composto (80).

Por outro lado, o Palbociclib também foi testado em linhas celulares de glioblastoma, que apresentam frequentemente alterações na via ciclina D1-CDK4/6-Rb, tendo sido observada uma diminuição da proliferação celular, apenas em linhas com a proteína Rb funcional, independentemente dos níveis elevados de CDK4 e CDK6 (81).

Estes estudos mostraram que a acção do Palbociclib pode não ser devida apenas à inibição directa dos seus alvos, CDK4/6, mas à sua acção indirecta noutros reguladores do ciclo celular, como as proteínas Rb e ciclina D1.

Embora a linha BCPAP derive de um carcinoma bem diferenciado (papilar), apresenta um perfil mutacional mais próximo dos carcinomas pouco diferenciados e ATC, que inclui em concomitância a mutação p.V600E no gene *BRAF* e uma mutação *missense* no gene *TP53* (70, 82), o que poderia justificar a resposta ao Palbociclib. Contudo a resposta ao composto foi consideravelmente menor do que nas linhas de ATC testadas. Este resultado corrobora a hipótese de que a acção do Palbociclib poderá ser mais pronunciada quanto maior for o número de alterações em genes relevantes na regulação do ciclo celular. Os resultados obtidos com as células de tiróide normal tratadas reforçam esta hipótese, uma vez que não se observaram diferenças no número total de células viáveis relativamente à condição não tratada.

Nos estudos de morte celular observaram-se diferenças consideráveis relativamente à presença ou ausência de mutações nas linhas de ATC, após tratamento com o Palbociclib, nas concentrações mais altas testadas. Com 15 μ M de Palbociclib a percentagem de morte celular aumentou cerca de 60 %, na linha C643, contrastando

com apenas 20 e 5 % nas linhas T238 e T235, respectivamente. Estes resultados sugeriram que as linhas celulares que apresentavam menos alterações nos genes alvo deste composto poderiam ser mais resistentes ao mesmo, o que está de acordo com os resultados anteriores. Resultados semelhantes foram também obtidos no estudo de Huang e colaboradores que observaram, em linhas celulares de cancro gástrico, também um aumento do número de células na fase G0/G1 do ciclo celular, mas sem efeito significativo na morte celular, com 5 μ M de Palbociclib. Nesse estudo, foi demonstrada a inibição do crescimento, e a diminuição da expressão das proteínas CDK4 e CDK6, em resposta ao Palbociclib, numa linha celular de cancro gástrico com mutação no gene *CDKN2A*, em comparação com uma linha celular *wt* (83).

O Palbociclib promove a sub-expressão de cinases importantes para a progressão do ciclo celular (84), o que está de acordo com a paragem do ciclo celular que se observou no presente estudo.

Estes resultados são promissores uma vez que o Palbociclib pareceu ter um efeito em linhas celulares de ATC que apresentam diversas alterações em genes reguladores do ciclo celular. Adicionalmente, sugeriu pela primeira vez que este composto poderia ser uma alternativa no tratamento de doentes com cancro da tiróide com alterações em genes reguladores do ciclo celular.

Até ao momento, o Palbociclib não foi testado em cancro da tiróide, contudo, tem sido testado noutros tipos de cancro, estando já em ensaios clínicos de fase II em cancro da mama, em fase I na Doença de *non-Hodgkin* (63) e em ensaios clínicos em diferentes tipos de cancro, tais como pulmão, ovário e próstata, com resultados positivos, demonstrando sempre uma actividade antiproliferativa (61, 81). Em cancro do pulmão, foram realizados ensaios clínicos em fase II, em 2015, em doentes com a proteína Rb *wt* e o gene *CDKN2A* inactivo, tendo-se observado uma redução de ~30 % no diâmetro das lesões tumorais alvo (*ClinicalTrials.gov* ID: NCT01291017). Em 2016, foram iniciados ensaios clínicos em fase II em cancro da próstata em doentes sem alterações na ciclina D1 e na proteína Rb (*ClinicalTrials.gov* ID: NCT02905318) e também em 2016 foram iniciados ensaios clínicos em fase II em doentes com carcinoma do ovário com a proteína Rb funcional e baixa expressão da p16 (*ClinicalTrials.gov* ID: NCT01536743).

Em 2014, num estudo com linhas celulares de carcinoma colo-rectal, tratadas com 1 μ M de Palbociclib, foi também observado um aumento do número de células na fase G0/G1 do ciclo celular e diminuição da expressão da proteína Rb fosforilada (85).

Num estudo de Rihani e colaboradores, realizado em 2015, foi demonstrado que o Palbociclib, como inibidor das CDK4 e CDK6, promovia a inibição da via ciclina D1-Rb (Figura 33) e consequentemente, levava à indução da paragem do ciclo celular na fase G0/G1. A proliferação celular das linhas de neuroblastoma estudadas diminuiu após o tratamento, também com 1 μ M de Palbociclib, pela inibição da fosforilação da proteína Rb. A hipofosforilação da proteína Rb devido à inibição das CDK4/6 pelo Palbociclib levou à inibição da actividade do factor de transcrição E2F (Figura 33), tendo-se observado uma diminuição da expressão dos genes alvo do E2F (*TOP2A* – *DNA Topoisomerase II alpha*, *CCNE2* – ciclina E2 e *TK1* – *Thymidine kinase 1*), essenciais para a síntese de DNA e progressão do ciclo celular. No referido trabalho, os autores propuseram a utilização do Palbociclib como uma forma indirecta de inibir a ciclina D1 e impedir assim, a progressão tumoral (86).

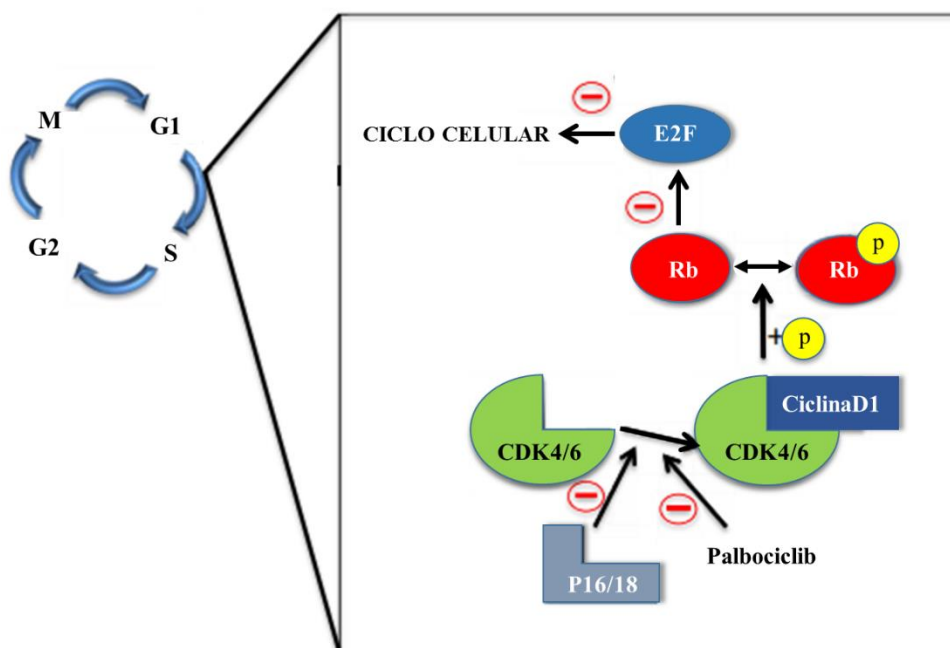


Figura 33 – Esquema representativo da acção do Palbociclib na via ciclina D1/CDK4/6/retinoblastoma durante o ciclo celular [adaptado de (81)].

M, mitose; G1, fase G1; S, fase S; G2, fase G2; Rb, retinoblastoma 1; CDK4/6, – cinases dependentes das ciclinas 4/6; P, grupo fosfato.

Actualmente têm sido desenvolvidos ensaios que visam a aprovação pela FDA (*Food and Drug Administration*) da primeira linha de tratamento de cancro da mama com Letrozol (inibidor da enzima aromatase) em combinação com o Palbociclib (58). Em doentes com cancro da mama avançado, foi testado o Palbociclib em combinação com o Letrozol e observou-se uma melhoria na sobrevivência média de vida em comparação com o Letrozol isolado (87).

Em melanomas cutâneos, as mutações nos genes *NRAS* e *BRAF* promovem a activação das CDK4/CDK6 sugerindo que inibidores como o Palbociclib podem resultar em benefícios terapêuticos em combinação com inibidores do BRAF e/ou MEK (Trametinib), já aprovados pela FDA. Estudos *in vitro* mostraram que a perda de função da p16^{INK4A} está correlacionada com a sensibilidade ao Palbociclib (80). Em linhas celulares de melanoma com a proteína p16^{INK4A} não funcional e que apresentam elevada expressão de CDK4 e ciclina D1 foi observada resistência à inibição das CDK4 e CDK6 com o Palbociclib. A fosforilação da proteína Rb e a expressão da ciclina A2 diminuíram com a exposição dessas células ao tratamento com 0,5 µM de Palbociclib, havendo também paragem do ciclo celular em G0/G1, mas não indução de morte celular. Também nestas linhas, foi testada a combinação do Palbociclib com o Trametinib para estudar o efeito do Palbociclib na morte celular e os resultados demonstraram, igualmente, diminuição da expressão da proteína Rb fosforilada, mas sem alterações significativas em proteínas pro-apoptóticas (BCL-2) (80).

O Palbociclib demonstrou ser um composto interessante no tratamento do cancro da tiróide, mas possivelmente com um mecanismo de acção noutros alvos moleculares, sendo que estudos desenvolvidos por outros grupos vão ao encontro dos resultados obtidos neste trabalho. Assim, será necessário continuar a estudar o mecanismo de actuação deste composto nas 4 linhas celulares testadas e prosseguir para estudos de expressão de RNA e de proteínas essenciais na regulação do ciclo celular e em processos apoptóticos. Será necessário avaliar a expressão das proteínas Rb fosforilada e total, da ciclina D1, das CDK4/6 e do factor de transcrição E2F por *Western Blot* e avaliar a expressão dos genes alvo desse factor de transcrição, de forma a clarificar qual o mecanismo de acção do Palbociclib que induz a paragem do ciclo celular na fase G1 em linhas celulares de ATC. É expectável que o tratamento com Palbociclib induza a hipofosforilação da proteína Rb e a sub-expressão do factor de transcrição

E2F, devido ao bloqueio do ciclo celular observado na transição da fase G1 para a fase S (Figura 33) (63, 88). Nas linhas sem mutações nos genes *CDKN2A* e *CDKN2B*, mas para as quais também se observou efeito com o Palbociclib, será necessário estudar a expressão de reguladores do complexo CDK4/6/ciclina D1 (p16, p15, p18, p21, p27 e p57), visto que podem estar envolvidos na paragem do ciclo celular nessas linhas se estiverem sobre-expressos.

5.2. Estudo do Tipifarnib

O Tipifarnib é um dos FTI (*farnesiltransferase inhibitors*) em desenvolvimento, que se encontra em estudos mais avançados (78), tendo sido demonstrado no presente estudo, que poderá ser um composto importante para inibição da progressão tumoral em linhas celulares de ATC.

As curvas dose-resposta obtidas pelos ensaios MTS permitiram calcular o IC₅₀ do Tipifarnib para as três linhas celulares de ATC (C643, T238 e T235) e demonstraram que a citotoxicidade do composto dependia da concentração utilizada.

Para o Tipifarnib, os valores de IC₅₀ obtidos para as linhas C643, T238 e T235 foram 15,2, 20,2 e 20,8 μ M, respectivamente. De acordo com as alterações atrás descritas para estas linhas celulares, estes resultados sugeriram que os valores de IC₅₀ estariam relacionados com as mutações no gene *HRAS*. Ou seja, a linha C643, sendo a única que apresenta mutação no gene *HRAS*, gene alvo do Tipifarnib, apresentou o valor de IC₅₀ mais baixo. Estes resultados indicaram que a linha C643 é mais sensível à acção deste composto, quando comparada com as outras linhas celulares, sendo necessária uma concentração inferior de Tipifarnib para induzir 50% da inibição da viabilidade celular.

Estudos realizados em 2010, em linhas celulares de osteossarcoma, também apresentaram diferentes níveis de sensibilidade ao Tipifarnib com concentrações entre 0,01 e 1 μ M. Esta variabilidade de respostas ao Tipifarnib também foi reportado em cancro do pâncreas (89) e em leucemia mieloide aguda (AML), embora com linhas celulares com *NRAS* e *KRAS* mutado e com IC₅₀ entre 19 e 134 nM (90). Em 2007 foi também testado numa linha celular de cancro da mama com *KRAS* mutado,

apresentando um IC₅₀ de 0,4 µM e levando a uma paragem do ciclo celular na fase G₀/G₁ (78).

O Tipifarnib como inibidor da activação do gene *RAS* pode ser um composto importante na inibição da via de sinalização RAS-RAF-MEK-ERK. Esta via desempenha um papel fundamental na tumorigénese, proliferação celular, apoptose e também na resistência a fármacos. Os inibidores desta via poderão ser promissores como opções terapêuticas para o cancro (91), especialmente em ATC que apresentam mutações em genes desta via.

As proteínas Ras são pequenas GTPases que regulam o crescimento, a diferenciação, a sobrevivência e a morte celular. Um dos principais processos de pós-tradução envolvidos na activação do *RAS*, a prenilação, é necessária para que ocorra transformação das células, sendo por isso um alvo importante para o desenvolvimento de novas terapêuticas contra o cancro.

Existem duas formas de prenilação, a farnesilação e a geranilgeranilação, mediada, respectivamente, pelos enzimas farnesiltransferase e geranilgeranil transferase. Os inibidores de farnesil transferase são pequenas moléculas que inibem a prenilação de múltiplas proteínas, incluindo as proteínas Ras, bloqueando a sua activação, sendo que o Tipifarnib pertence a esta classe de inibidores (92).

A proteína Ras depois de ser prenitada, associa-se à membrana celular funcionando numa via de transdução de sinal e alternando entre a forma activa (Ras-GTP) e a forma inactiva (Ras-GDP). Todas as isoformas do *RAS*, HRas, NRas e KRas, podem ser farnesiladas. No entanto, as KRas e NRas também podem ser prenitadas pela geranilgeranil transferase. Assim, NRas e KRas podem sofrer uma prenilação alternativa pela geranilgeranil transferase, quando a farnesilação é inibida (92).

As várias isoformas do gene *RAS* estão envolvidas na activação das vias efectoras através de processos bioquímicas distintos, levando por isso ao desenvolvimento de tumores com características diferentes e, consequentemente, a respostas terapêuticas distintas (93).

De acordo com o mecanismo de acção acima descrito para o Tipifarnib, os resultados do presente estudo sugeriram que este composto podia ter um efeito anti-tumoral em células de ATC com *HRAS* mutado (C643), que não foi observado em células de ATC sem essa mutação (T238 e T235).

Neste estudo, quando se trataram as células com 0,1 μM de Tipifarnib observou-se, na linha C643, um aumento de cerca de 40 % de células na fase G2/M do ciclo celular. No entanto, para as restantes duas linhas celulares (T238 e T235) não se observaram diferenças significativas no ciclo celular, em relação ao controlo, com concentrações entre 0,1 e 10 μM deste composto. Os ensaios de viabilidade celular confirmaram a resposta específica da linha C643 ao Tipifarnib, tendo-se observado com 0,1 μM deste composto, às 48 h, uma redução de aproximadamente 57 % do número de células viáveis, contrastando com a ausência de resposta das linhas T238 e T235.

Estes resultados sugeriram que houve paragem do ciclo celular na fase G2/M, não se tendo observado um aumento da morte celular. Em estudos realizados por outros grupos, foi descrito que o Tipifarnib promovia o aumento do número de células em apoptose em linhas celulares de melanoma com *NRAS* mutado e em linhas celulares de mieloma múltiplo com *HRAS* e *NRAS* mutado com concentrações entre 0,01 e 1 μM (90, 94).

O Tipifarnib já foi testado em ensaios clínicos de fase II em AML e de fase III na Doença de Hodgkin's (68).

Mandy Geryk-Hall e colaboradores, num estudo realizado em 2010, em linhas celulares de osteossarcoma, também observaram que havia inibição do crescimento celular marcado por um aumento do número de células em fase G2/M quando tratadas com Tipifarnib (linha OS187 – sem mutação no *RAS*). Assim, estes resultados não demonstraram especificidade na resposta do Tipifarnib para mutações no *HRAS* com concentrações entre 0,01 e 1 μM . Foram estudadas outras linhas celulares sem mutação no *RAS*, mas com uma resposta inferior ao composto (92).

Em doentes com cancro da tiróide (MTC e WDTC), foram testados os níveis de toxicidade do Tipifarnib em combinação com Sorafenib (inibidor de receptores com actividade de tirosina cinase) em ensaios clínicos de fase I (66). Estes estudos foram realizados em doentes com tumores avançados de PTC e FTC com mutações somáticas nos genes *BRAF* e *KRAS*, respectivamente, e em MTC com mutações germinais no gene *RET*, tendo sido observada uma resposta na estabilização da doença, neste último caso devido à inibição da proteína RET pelo Sorafenib (66). O Gefitinib (inibidor de EGFR) em combinação com o Tipifarnib foi testado na linha C643, por Frasca e colaboradores em 2013, sendo que o Tipifarnib melhorou significativamente o efeito

do Gefitinib na viabilidade celular e inibiu quase por completo a fosforilação da proteína ERK, contrariamente ao que foi observado com o Gefitinib isolado (69). Foram obtidos os mesmos resultados com o Gefitinib isolado para a linha BCPAP (com *RAS wt*), sendo que em combinação com o Tipifarnib não houve qualquer alteração do efeito, o que sugere especificidade do Tipifarnib para tratamento de células tumorais com *HRAS* mutado (69).

Outros estudos, em ensaios clínicos em fase I com Tipifarnib, revelaram respostas clínicas em adultos com leucemias agudas. Houve diminuição do crescimento e da proliferação celular, genes envolvidos na proliferação celular encontraram-se sub-expressos após tratamento com o Tipifarnib, tanto em amostras de doentes como em linhas celulares e houve sobre-expressão de genes envolvidos na adesão celular, activação da apoptose e na resposta imune. No entanto, não houve distinção na resposta ao Tipifarnib entre linhas celulares de AML, não tendo sido correlacionado o tipo de mutação no *RAS* com a sensibilidade a este composto (90).

Outro inibidor da farnesil transferase, o SCS66336, foi também testado anteriormente e revelou-se mais eficaz em linhas celulares com *HRAS* mutado, duas delas de ATC (C643 e Hth83), comparativamente a linhas celulares também de ATC com *NRAS* (Hth7) e *KRAS* (Cal62), que demonstraram ser mais resistentes. Para além de linhas de tiróide, este estudo foi realizado também em linhas celulares de cancro da mama, bexiga e melanoma com *HRAS* mutado, observando-se também inibição do crescimento celular, mas não havendo resposta nas linhas de tiróide, pulmão e melanoma com mutações nos genes *NRAS* e *KRAS* (18, 67). Estes estudos pré-clínicos demonstraram que os inibidores do enzima farnesil transferase podem bloquear a acção deste enzima, necessária para a correcta localização da proteína Ras na membrana da célula e inibir selectivamente o crescimento celular (18).

Em 2012 foram realizados ensaios clínicos de fase II em doentes pediátricos com neurofibromatose e com o gene *RAS* constitutivamente activo (*ClinicalTrials.gov* ID: NCT00021541) e em doentes com leucemia linfocítica crónica, em 2016, observando-se ausência de progressão da doença (*ClinicalTrials.gov* ID: NCT00082888).

Os resultados obtidos no presente trabalho podem ter ido ao encontro do que já foi descrito em estudos anteriores, onde foi demonstrado que, quando a farnesilação do *HRAS* mutado é inibida pelo Tipifarnib, a sinalização a jusante é consequentemente

inibida, resultando na diminuição da sobrevivência e proliferação celular, sendo que as outras isoformas do *RAS* podem ser preniladas por outra enzima, a geranilgeranil transferase (92), deixando de ser inibidas por este composto.

Os presentes resultados sugeriram que o Tipifarnib pode ser um composto interessante a usar no tratamento de tumores com uma mutação específica no gene *HRAS*, sendo que tumores com mutações no *NRAS* e *KRAS* poderão não responder a esse composto.

Por outro lado, o Tipifarnib revelou-se um composto com pouco impacto na morte celular das linhas testadas de ATC, excepto quando foi utilizado a concentração mais elevada.

Numa etapa seguinte, para esclarecer quais os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos observados para o Tipifarnib nas linhas celulares de ATC, C643, T238 e T235, estudou-se a expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, nas referidas linhas. Por quantificação relativa (qRT-PCR) foi estudada a expressão génica de genes envolvidos no controlo dos *checkpoints* do ciclo celular na fase G1/S (*CDK4*, *CDK6* e *CCND1*), S/G2 (*CCNA2*, *CDK2*), G2/M (*CCNA2*, *CDC2*) e M (*CCNB1*, *CDC2*) de forma a avaliar por outros métodos o efeito Tipifarnib no ciclo celular. A selecção destes genes baseou-se em estudos anteriores da regulação dos *checkpoints* do ciclo celular na fase G2/M (95-98). O complexo ciclina D/CDK4/CDK6 é activado por factores mitóticos e permite a transcrição de genes necessários para a progressão da fase G1 para a fase S, sendo que após a entrada da célula na fase S, este complexo deixa de ser necessário. Durante a transição da fase G1 para a fase S, o complexo ciclina E/CDK2 é activado; Na fase S, a ciclina A liga-se à CDK2 permitindo a transição de fase para G2. A ciclina A pode ligar-se também à Cdk1 durante a transição da fase G2 para a fase M. O complexo ciclina B/CDK1 (*Mitosis Promoting Factor*) também actua durante a transição da fase G2 para a fase M e, se este complexo estiver sobre-expresso, as células entram em Mitose, sendo também necessário haver degradação das ciclinas A e B1 para ocorrer essa transição (Figura 34) (99). Enquanto que as CDK estão presentes ao longo do ciclo celular, a concentração das ciclinas vai aumentando e diminuindo, sendo, por vezes, necessária a sua degradação para que ocorra transição de fases, exceptuando a ciclina D1 (Figura 35).

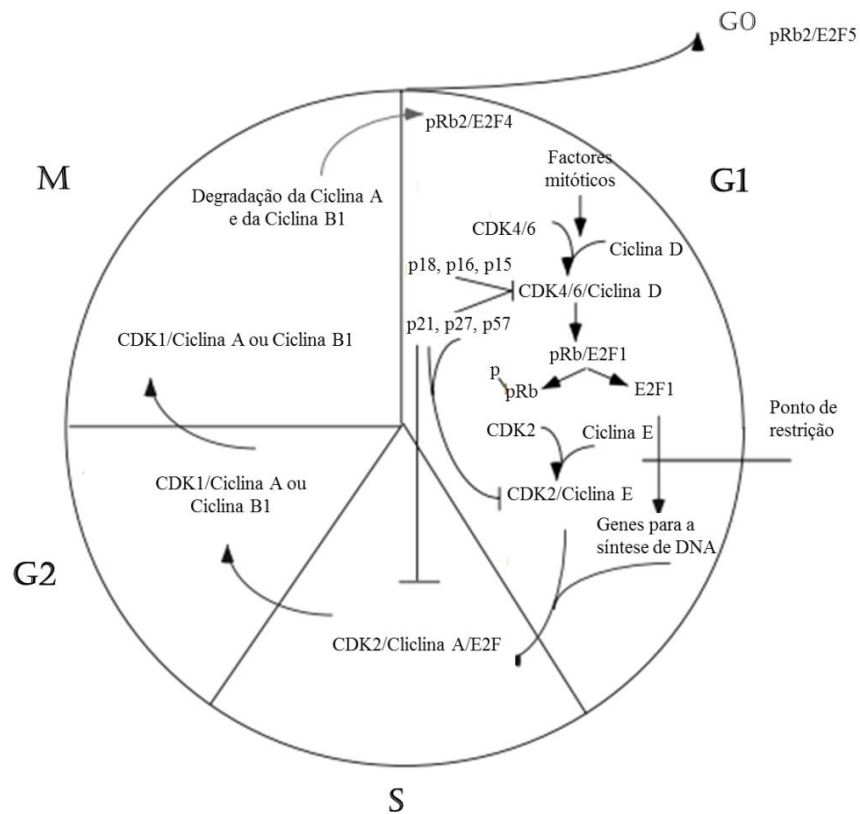


Figura 34 – Esquema representativo da relação entre ciclinas e CDK durante o ciclo celular [adaptado de (99)].

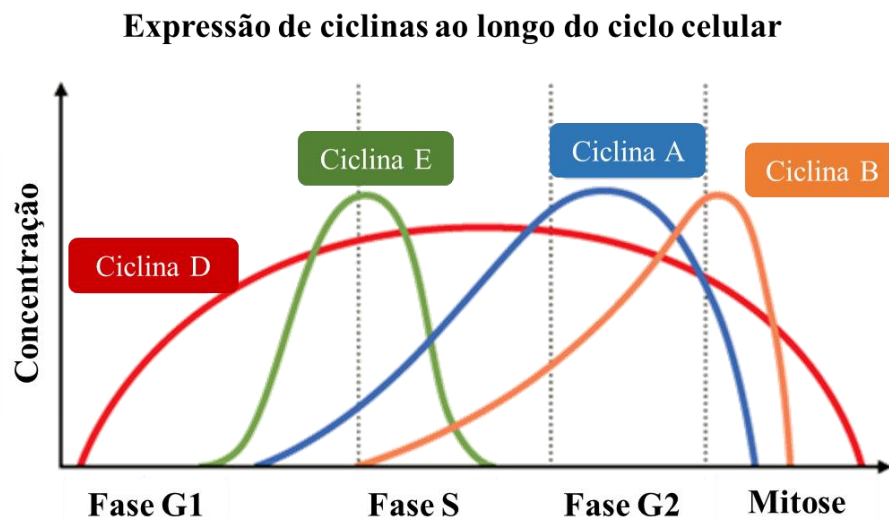


Figura 35 – Concentração relativa das diferentes ciclinas ao longo do ciclo celular [adaptado de (100)].

Neste estudo observou-se que nas 3 linhas não houve alterações significativas na expressão dos genes envolvidos nos *checkpoints* da fase G1 nem da fase G2. No entanto, apesar dos resultados não serem estatisticamente significativos, houve um aumento da expressão dos genes *CCNA2* e *CDK2*.

Para haver paragem do ciclo celular na fase G2, os reguladores que permitem a progressão do ciclo celular na fase G2/M deveriam estar inibidos (6, 38, 95-97). No entanto, para haver progressão do ciclo celular na mitose, tem de haver inactivação desses complexos reguladores pela degradação das respectivas ciclinas, ciclina A e ciclina B1 (Figura 34) (99). Assim, o aumento da expressão do gene *CCNA2* relativamente ao controlo, nos resultados obtidos neste projecto, justificaram a paragem do ciclo celular na fase G2/M, mostrando que não houve a degradação necessária da ciclina A2. Sendo que as ciclinas só são necessárias para activar as respectivas CDK, havendo um aumento da expressão do gene *CCNA2*, consequentemente irá haver um aumento da respectiva CDK, CDK1 (99). Tal como observado nos resultados apresentados, onde se observa um ligeiro aumento da expressão do gene *CDK2*. Relativamente ao gene *CDK2*, o seu aumento de expressão pode dever-se à sobre-expressão de outras proteínas (p21, p27 e p57) envolvidas na fase G1 do ciclo celular que têm como função inibir o complexo CDK2/ciclina E (Figura 34). Este complexo, ao ser inibido, irá manter os níveis elevados do complexo CDK4/6/ciclina D1 que o antecede (99).

Neste estudo, relativamente aos genes envolvidos na regulação do checkpoint G1/S do ciclo celular observou-se um ligeiro aumento da expressão dos genes *CDK4* e *CDK6* na linha C643, que pode ser justificado pelo facto dos inibidores referidos estarem sobre-expressos.

Por outro lado, houve uma ligeira diminuição da expressão do gene *CCND1* na linha celular C643 quando tratada com Tipifarnib, sendo concordante com a literatura, uma vez que não havendo degradação da ciclina A, a proteína Rb não seria fosforilada e a ciclina D1 não seria activada (Figura 35).

Pela análise dos resultados obtidos por qRT-PCR confirmou-se a necessidade de, futuramente, estudar a expressão de algumas proteínas essenciais na regulação do ciclo celular. Por *Western Blot*, poderá observar-se os níveis de expressão das ciclinas D, A, E e B1, da proteína Rb fosforilada e total, sendo que deverá estar desfosforilada, e a

expressão dos inibidores p21, p27 e p57 de forma a comprovar a paragem do ciclo celular na transição G2/M. Será igualmente importante confirmar se a proteína HRas está ou não prenilada (69), para confirmar a especificidade do Tipifarnib e analisar a expressão de proteínas envolvidas na via efectora do gene *HRAS*, AKT, ERK e MEK (78, 91, 92, 101).

Tendo em conta os resultados obtidos neste estudo e a paragem do ciclo celular na transição entre a fase G2 e a fase M da linha C643 tratada com Tipifarnib, será também necessário estudar futuramente o efeito deste composto nas vias apoptóticas, uma vez que se as células estão senescentes em G2 vão acabar por entrar em apoptose. Assim, por *Western Blot* será necessário estudar a expressão de proteínas envolvidas nestas vias, tais como, BCL-2, BAX e proteínas caspases (69).

Frequentemente, em ratos e linhas celulares humanas, observa-se que a sobre-expressão da proteína p53 também inibe a entrada das células em mitose. Este *checkpoint* parece ser activado quando o DNA sintetizado na fase S está danificado, não sendo totalmente conhecido o mecanismo de paragem do ciclo celular na fase G2/M. É provável que a p53 induza essa paragem pela diminuição da transcrição e síntese da ciclina B1 (99). Assim, será também necessário avaliar futuramente a expressão da proteína p53 e da ciclina B1 para confirmar esta paragem do ciclo celular em G2/M com o Tipifarnib.

6. Conclusões e perspectivas

Os estudos pré-clínicos desenvolvidos no âmbito da presente tese constituíram uma etapa inicial para o conhecimento do efeito do Palbociclib e do Tipifarnib, em linhas celulares de ATC e, desta forma, para esclarecer qual a relevância que estes compostos poderão vir a ter na terapêutica das formas mais agressivas de cancro da tiróide.

Os resultados dos estudos do ciclo e da proliferação celular revelaram uma resposta significativa em 4 linhas celulares ao Palbociclib e da linha C643 ao Tipifarnib, o que seria espectável de acordo com os alvos moleculares alterados nestas células. Por outro lado, os ensaios de morte celular mostraram que os dois compostos testados apenas induziram morte celular significativa quando testados em doses muito próximas dos IC50 de cada linha celular.

Neste estudo, foram realizados estudos preliminares do efeito do Tipifarnib na expressão de alvos moleculares específicos. Será, no entanto, necessário estender este estudo a mais alvos moleculares, analisando o efeito não só na expressão de mRNA por qRT-PCR, mas também na expressão proteica por *Western Blot* de forma a compreender os seus mecanismos de acção.

Relativamente ao Palbociclib será importante compreender qual o mecanismo de acção desse composto nas linhas celulares estudadas, sem mutação para os seus genes alvo. Para o Tipifarnib, pretende-se também testar este composto noutras linhas celulares de tiróide, com mutações isoladas de *HRAS* (Hth83), *KRAS* (Cal62) ou *NRAS* (Hth7), para confirmar a sua especificidade para a isoforma *HRAS* mutada. Será também importante estudar este composto em células normais de tiróide.

Será também estudado o efeito do Palbociclib e do Tipifarnib em modelos celulares tridimensionais (3D) de tiróide, isoladamente e em associação com agentes imunomoduladores (em co-culturas), de forma a aproximar os ensaios *in vitro* o mais possível da realidade tumoral que ocorre num doente com ATC.

Mais tarde, seria interessante testar estes compostos em xenograftos, em modelos murinos imunocomprometidos, para avaliar o efeito destes compostos no desenvolvimento de ATC.

Esperamos que este projecto represente uma etapa inicial no desenvolvimento de terapêuticas para doentes com ATC, dado que actualmente não existem alternativas terapêuticas para estas formas mais agressivas de cancro da tiróide.

7. Referências Bibliográficas

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
2. Landa I, Ibrahimipasic T, Boucai L, Sinha R, Knauf JA, Shah RH, et al. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *The Journal of Clinical Investigation*. 2016;126.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
4. Weinberg RA. How Cancer Arises. *Scientific American, Inc.* 1996:62-70.
5. Weinberg RA. Oncogenes and tumor suppressor genes. *A Cancer*. 1994;44:160-70.
6. Park M-T, Lee S-J. Cell cycle and cancer. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2003;6:60-5.
7. Jones CJ, Shawb JJ, Wyllieb FS, Gaillard N, Schlumberger M, Wynford-Thomas D. High frequency deletion of the tumour suppressor gene P16INK4a (MTS1) in human thyroid cancer cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1996;116:115-9.
8. Croce CM. Molecular Origins of Cancer - Oncogenes and cancer. *The new england journal of medicine*. 2008(358):502-11.
9. You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer cell*. 2012;22(1):9-20.
10. Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(4):292-306.
11. Muro-Cacho CA, Ku, N.N. Tumors of the thyroid gland: histologic and cytologic features - Part 1. *Cancer Control*. 2000;7:276-87.
12. Erickson LA. *Endocrine Pathology*. 2011:903-53.
13. Nguyen QT, Lee EJ, Huang MG, Park YI, Khullar A, Plodkowski RA. Diagnosis and Treatment of Patients with Thyroid Cancer. *American Health & Drug Benefits*. 2015;8:30-40.
14. Stathatos N. Thyroid physiology. *The Medical clinics of North America*. 2012;96(2):165-73.
15. MedlinePlus. Thyroidectomy - series—Normal anatomy. Accessed: August 2016. Available from: https://medlineplus.gov/ency/presentations/100135_1.htm.
16. Regulation APH. Cell types of the Thyroid Gland & what they secrete. Accessed: August 2016. Available from: <https://quizlet.com/3280558/ap5-hormonal-regulation-flash-cards/>.
17. Kitahara CM, Sosa JA. The changing incidence of thyroid cancer. *Nature reviews Endocrinology*. 2016.
18. Bible KC, Ryder M. Evolving molecularly targeted therapies for advanced-stage thyroid cancers. *Nature reviews Clinical oncology*. 2016;13(7):403-16.
19. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nature reviews Endocrinology*. 2011;7(10):569-80.
20. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(3):184-99.
21. Pinheiro T. Identificação de novos genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar - caracterização funcional do gene C8orf48 [Tese de Mestrado]: Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologias; 2015.
22. Matias A. Study of novel compounds for the treatment of anaplastic thyroid carcinomas [Tese de Mestrado]: Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências; 2014.
23. Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, et al. Expression of PAX8-PPAR γ 1 Rearrangements in Both Follicular Thyroid Carcinomas and Adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87 (8):3947-52.
24. Tavares C, Melo M, Cameselle-Teijeiro JM, Soares P, Sobrinho-Simoes M. ENDOCRINE TUMOURS: Genetic predictors of thyroid cancer outcome. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2016;174(4):R117-26.

25. Liu R, Xing M. TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*. 2016;23(3):R143-55.
26. Melo M, da Rocha AG, Vinagre J, Sobrinho-Simoes M, Soares P. Coexistence of TERT promoter and BRAF mutations in papillary thyroid carcinoma: added value in patient prognosis? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(6):667-8.
27. Xu B, Ghossein R. Genomic Landscape of poorly Differentiated and Anaplastic Thyroid Carcinoma. *Endocrine pathology*. 2016.
28. Pita JM, Banito A, Cavaco BM, Leite V. Gene expression profiling associated with the progression to poorly differentiated thyroid carcinomas. *British journal of cancer*. 2009;101(10):1782-91.
29. Pita JM, Figueiredo IF, Moura MM, Leite V, Cavaco BM. Cell cycle deregulation and TP53 and RAS mutations are major events in poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(3):E497-507.
30. Soares P, Lima J, Preto A, Castro P, Vinagre J, Celestino R, et al. Genetic alterations in Poorly Differentiated Thyroid Carcinomas. *Bentham Science Publishers*. 2011;12:609-17.
31. Rusinek D, Szpak-Ulczo S, Jarzab B. Gene expression profile of human thyroid cancer in relation to its mutational status. *Journal of molecular endocrinology*. 2011;47(3):R91-103.
32. Buffet C, Groussin L. Molecular perspectives in differentiated thyroid cancer. *Annales d'Endocrinologie*. 2015;76(1):1S8-1S15.
33. John W. Kunstman, James M. Healy, Korah M, C. Christofer Juhlin, Jill C. Rubinstein, David L. Rimm, et al. Characterization of the mutational landscape of anaplastic thyroid cancer via whole exome sequencing. *Human molecular genetics*. 2015;24(8):2318-29.
34. Delelli RA. Pathology and Genetics of Thyroid Carcinoma. *Journal of Surgical Oncology* 2006;94:662-9.
35. Giuffrida D, Prestifilippo A, Scarfia A, Martino D, Marchisotta S. New treatment in advanced thyroid cancer. *Journal of oncology*. 2012;2012:391629.
36. Ahmed TA, Hayslip J, Leggas M. Simvastatin interacts synergistically with tipifarnib to induce apoptosis in leukemia cells through the disruption of RAS membrane localization and ERK pathway inhibition. *Leukemia research*. 2014;38(11):1350-7.
37. Roberts PJ, Bisi JE, Strum JC, Combest AJ, Darr DB, Usary JE, et al. Multiple roles of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012;104(6):476-87.
38. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. *Essential cell biology*. 3 ed 2010.
39. CuboCube. CDK and Cyclin. Accessed: August 2016. Available from: <http://www.cubocube.com/dashboard.php?a=1642&b=1691&c=1>.
40. Marval PLMd, Zhang Y. The RP-Mdm2-p53 pathway & tumorigenesis. *Oncotarget*. 2011;2:234-8.
41. Ozaki T, Nakagawara A. p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011;2011:603925.
42. Bourdon JC. p53 and its isoforms in cancer. *British journal of cancer*. 2007;97(3):277-82.
43. Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(10):701-13.
44. Freed-Pastor WA, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes & development*. 2012;26(12):1268-86.
45. Lambert JM, Gorzov P, Veprintsev DB, Soderqvist M, Segerback D, Bergman J, et al. PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer cell*. 2009;15(5):376-88.

46. Bao W, Chen M, Zhao X, Kumar R, Spinnler C, Thullberg M, et al. PRIMA-1Met/APR-246 induces wild-type p53-dependent suppression of malignant melanoma tumor growth in 3D culture and in vivo. *Cell Cycle*. 2011;10(2):301-7.
47. Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(1):84-93.
48. Mohell N, Liljebris C, Alfredsson J, Lindman Y, Uustalu M, Wiman KG, et al. Further Preclinical Studies with APR-246, a Novel Anticancer Compound Currently in Clinical Trials for Hematological Malignancies and Prostate Cancer. Poster Session: Molecular Pharmacology, Drug Resistance. 2009;Poster Board III-709.
49. Saha MN, Qiu L, Chang H. Targeting p53 by small molecules in hematological malignancies. *Journal of hematology & oncology*. 2013;6:23.
50. Wu Q, Wang X, Liu J, Zheng J, Liu Y, Li Y, et al. Nutlin-3 reverses the epithelial-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant hepatocellular carcinoma cells. *Oncology reports*. 2016.
51. Kojima AK, Konopleva M, McQueen T, O'Brien S, Plunkett W, Andreeff M. Mdm2 inhibitor Nutlin-3a induces p53-mediated apoptosis by transcription-dependent and transcription-independent mechanisms and may overcome Atm-mediated resistance to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006;108:993-1000.
52. Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, Shikami M, Cabreira-Hansen M, McQueen T, et al. MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy. *Blood*. 2005;106(9):3150-9.
53. Ooi MG, Hayden PJ, Kotoula V, McMillin DW, Charalambous E, Daskalaki E, et al. Interactions of the Hdm2/p53 and proteasome pathways may enhance the antitumor activity of bortezomib. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(23):7153-60.
54. Steelman JAMLS, Chappell WH, Sun L, Davis NM, Abrams SL, Franklin RA, et al. Advances in Targeting Signal Transduction Pathways. *Oncotarget*. 2012;3:1505-21.
55. Maerken TV, Rihani A, Goethem AV, Paepe AD, Speleman F, Vandesompele J. Selective inhibition of the p53-MDM2 interaction by nutlin drugs: a new therapeutic perspective for neuroblastoma. *Proceedings of the Belgian Royal Academies of Medicine*. 2013;2:198-207.
56. Zauli G, Celeghini C, Melloni E, Voltan R, Ongari M, Tiribelli M, et al. The sorafenib plus nutlin-3 combination promotes synergistic cytotoxicity in acute myeloid leukemic cells irrespectively of FLT3 and p53 status. *Haematologica*. 2012;97(11):1722-30.
57. Vatsyayan R, Singhal J, Nagaprashantha LD, Awasthi S, Singhal SS. Nutlin-3 enhances sorafenib efficacy in renal cell carcinoma. *Molecular carcinogenesis*. 2013;52(1):39-48.
58. Schmidt M. Palbociclib - from Bench to Bedside and Beyond. *Breast care*. 2016;11(3):177-81.
59. Williams RT, Barnhill LM, Kuo HH, Lin WD, Batova A, Yu AL, et al. Chimeras of p14ARF and p16: functional hybrids with the ability to arrest growth. *PloS one*. 2014;9(2):e88219.
60. Lee JJ, Au AY, Foukakis T, Barbaro M, Kiss N, Clifton-Bligh R, et al. Array-CGH identifies cyclin D1 and UBCH10 amplicons in anaplastic thyroid carcinoma. *Endocrine-related cancer*. 2008;15(3):801-15.
61. Ehab M, Elbaz M. Profile of palbociclib in the treatment of metastatic breast cancer. *Breast cancer*. 2016;8:83-91.
62. Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, al. e. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2004;3.
63. Flaherty KT, Lorusso PM, Demichele A, Abramson VG, Courtney R, Randolph SS, et al. Phase I, dose-escalation trial of the oral cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor PD 0332991, administered using a 21-day schedule in patients with advanced cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(2):568-76.

64. Lawrence MC, Jivan A, Shao C, Duan L, Goad D, Zaganjor E, et al. The roles of MAPKs in disease. *Cell research*. 2008;18(4):436-42.
65. Legakis I, Syrigos K. Recent advances in molecular diagnosis of thyroid cancer. *Journal of thyroid research*. 2011;2011:384213.
66. Hong DS, Cabanillas ME, Wheeler J, Naing A, Tsimberidou AM, Ye L, et al. Inhibition of the Ras/Raf/MEK/ERK and RET kinase pathways with the combination of the multikinase inhibitor sorafenib and the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in medullary and differentiated thyroid malignancies. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(4):997-1005.
67. Chen X, Makarewicz JM, Knauf JA, Johnson LK, Fagin JA. Transformation by Hras(G12V) is consistently associated with mutant allele copy gains and is reversed by farnesyl transferase inhibition. *Oncogene*. 2014;33(47):5442-9.
68. Ding H, McDonald JS, Yun S, Schneider PA, Peterson KL, Flatten KS, et al. Farnesyltransferase inhibitor tipifarnib inhibits Rheb prenylation and stabilizes Bax in acute myelogenous leukemia cells. *Haematologica*. 2014;99(1):60-9.
69. Frasca F, Vella V, Nicolosi ML, Messina RL, Giani F, Lotta S, et al. Thyroid cancer cell resistance to gefitinib depends on the constitutive oncogenic activation of the ERK pathway. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(6):2502-12.
70. Pilli T, Prasad KV, Jayarama S, Pacini F, Prabhakae BS. Potential Utility and Limitations of Thyroid Cancer Cell Lines as Models for Studying Thyroid Cancer. *THYROID*. 2009;19(12).
71. Saavedra HI, Knauf JA, Shirokawa JM, Wang J, Ouyang B, Elisei R, et al. The RAS oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the MAPK pathway. *Oncogene*. 2000;19:3948-54.
72. Teimourian S, Moghanloo E. Thwarting PTEN Expression by siRNA Augments HL-60 Cell Differentiation to Neutrophil-Like Cells by DMSO and ATRA. *DNA AND CELL BIOLOGY*. 2016;35(10):1-8.
73. Tabet L, Welman M, Castellanos L, Maghni K. Human bronchial smooth muscle cell (HBSMC) nanocytotoxic responses to quantum dots exposure: Incidence oh the lung pathology. Accessed: August 2016 2012. Available from: http://pt.slideshare.net/Ne3LS_Network/lyes-tabethuman-bronchial-smooth-muscle-cells-and-nanocytotoxic-responses-to-quantum-dots-exposure-incidence-of-lung-pathology.
74. Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 4th edition ed2012.
75. Laboratories B-R. *Real-Time PCR: Applications Guide*2006.
76. Sawyers C. Targeted cancer therapy. *Nature*. 2004;432.
77. Figueiredo I. Identificação de alterações moleculares envolvidas na progressão e desdiferenciação dos carcinomas da tiróide. [Tese de Mestrado]: Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologias; 2012.
78. Martin LA, Head JE, Pancholi S, Salter J, Quinn E, Detre S, et al. The farnesyltransferase inhibitor R115777 (tipifarnib) in combination with tamoxifen acts synergistically to inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation and cell cycle progression in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(9):2458-67.
79. Sathe A, Koshy N, Schmid SC, Thalgott M, Schwarzenbock SM, Krause BJ, et al. CDK4/6 Inhibition Controls Proliferation of Bladder Cancer and Transcription of RB1. *The Journal of urology*. 2016;195(3):771-9.
80. Teh JLF, Purwin TJ, Greenawalt EJ, Chervoneva I, Goldberg A, Davies MA, et al. An in vivo reporter to quantitatively and temporally analyze the effects of CDK4/6 inhibitor-based therapies in melanoma. *Melanoma Research Alliance and Pfizer, Inc*. 2016.
81. Schroder LB, McDonald KL. CDK4/6 Inhibitor PD0332991 in Glioblastoma Treatment: Does It Have a Future? *Frontiers in oncology*. 2015;5:259.
82. Dettori T, Frau DV, Garcia JL, Pierantoni G, Lee C, Hernandez JM, et al. Comprehensive conventional and molecular cytogenetic characterization of B-CPAP, a human papillary thyroid carcinoma-derived cell line. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2004;151(2):171-7.

83. Huang S, Ye H, Guo W, Dong X, Wu N, Zhang X, et al. CDK4/6 inhibitor suppresses gastric cancer with CDKN2A mutation. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(7):11692-700.
84. Nomanbhoy TK, Sharma G, Brown H, Wu J, Aban A, Vogeti S, et al. Chemoproteomic Evaluation of Target Engagement by the Cyclin-Dependent Kinase 4 and 6 Inhibitor Palbociclib Correlates with Cancer Cell Response. *Biochemistry*. 2016.
85. Li C, Qi L, Bellail AC, Hao C, Liu T. PD-0332991 induces G1 arrest of colorectal carcinoma cells through inhibition of the cyclin-dependent kinase-6 and retinoblastoma protein axis. *Oncology letters*. 2014;7(5):1673-8.
86. Rihani A, Vandesompele J, Speleman F, Van Maerken T. Inhibition of CDK4/6 as a novel therapeutic option for neuroblastoma. *Cancer cell international*. 2015;15:76.
87. Bowles PHJ, Clarke NPCKL. Palbociclib: A New Option for Front-Line Treatment of Metastatic, Hormone Receptor-Positive, HER2-Negative Breast Cancer. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*. 2015;6(6).
88. Leonard JP, LaCasce AS, Smith MR, Noy A, Chirieac LR, Rodig SJ, et al. Selective CDK4/6 inhibition with tumor responses by PD0332991 in patients with mantle cell lymphoma. *Blood*. 2012;119(20):4597-607.
89. Venkatasubbarao K, Choudary A, Freeman JW. Farnesyl Transferase Inhibitor (R115777)-Induced Inhibition of STAT3 (Tyr705) Phosphorylation in Human Pancreatic Cancer Cell Lines Require Extracellular Signal-Regulated Kinases. *Cancer research*. 2005;65: (7):2861-71.
90. Raponi M, Belly RT, Karp JE, Lancet JE, Atkins D, Wang Y. Microarray analysis reveals genetic pathways modulated by tipifarnib in acute myeloid leukemia. *BMC cancer*. 2004;4:56.
91. Suzuki R, Kikuchi S, Harada T, Mimura N, Minami J, Ohguchi H, et al. Combination of a Selective HSP90alpha/beta Inhibitor and a RAS-RAF-MEK-ERK Signaling Pathway Inhibitor Triggers Synergistic Cytotoxicity in Multiple Myeloma Cells. *PloS one*. 2015;10(12):e0143847.
92. Geryk-Hall M, Yang Y, Hughes DP. Driven to death: Inhibition of farnesylation increases Ras activity and promotes growth arrest and cell death [corrected]. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(5):1111-9.
93. Rowinsky EK, Windle JJ, Hoff DDV. Ras Protein Farnesyltransferase: A Strategic Target for Anticancer Therapeutic Development. *BIOLOGY OF NEOPLASIA*. 1999;17:3631-52.
94. Ochiai N, Uchida R, Fuchida S, Okano A, Okamoto M, Ashihara E, et al. Effect of farnesyl transferase inhibitor R115777 on the growth of fresh and cloned myeloma cells in vitro. *Blood*. 2003;102(9):3349-53.
95. Deng C, Zhang B, Zhang S, Duan C, Cao Y, Kang W, et al. Low nanomolar concentrations of Cucurbitacin-I induces G2/M phase arrest and apoptosis by perturbing redox homeostasis in gastric cancer cells in vitro and in vivo. *Cell death & disease*. 2016;7:e2106.
96. Gao X, Fan L, Li H, Li J, Liu X, Sun R, et al. Hepatic injury is associated with cell cycle arrest and apoptosis with alteration of cyclin A and D1 in ammonium chloride-induced hyperammonemic rats. *Experimental and therapeutic medicine*. 2016;11(2):427-34.
97. Kuo PL, Hsu YL, Cho CY. Plumbagin induces G2-M arrest and autophagy by inhibiting the AKT/mammalian target of rapamycin pathway in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(12):3209-21.
98. Buahorm S, Puthong S, Palaga T, Lirdprapamongkol K, Phuwapraisirisan P, Svasti J, et al. Cardanol isolated from Thai *Apis mellifera* propolis induces cell cycle arrest and apoptosis of BT-474 breast cancer cells via p21 upregulation. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*. 2015;23:55.
99. Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and Apoptosis. *Neoplasia*. 2000;2:291-9.
100. Biology B. Regulator Molecules of the Cell Cycle. Accessed: September 2016. Available from: <https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/cell-reproduction-10/control-of-the-cell-cycle-89/regulator-molecules-of-the-cell-cycle-399-11626/>.
101. Wang CC, Liao YP, Mischel PS, Iwamoto KS, Cacalano NA, McBride WH. HDJ-2 as a target for radiosensitization of glioblastoma multiforme cells by the farnesyltransferase inhibitor R115777 and the role of the p53/p21 pathway. *Cancer research*. 2006;66(13):6756-62.

8. Anexo I

8.1. Materiais e Métodos suplementares

8.1.1. Cultura de células

O manuseamento das células foi sempre realizado em ambiente estéril, numa câmara de fluxo laminar (*Microflow Biological Safety Cabinet, Intermed[®]*) e todas as células foram mantidas numa estufa (*NuaireTM US Autoflow CO₂ Water-Jacketed Incubator*), num ambiente humidificado, a 5 % CO₂ e à temperatura de 37 °C.

Todos os meios e reagentes (alíquotas de soluções stock) foram conservados a 4 °C e, antes de usar, foram aquecidos a 37 °C de forma a evitar que as variações de temperatura causassem *stress* celular. Para manter a esterilidade, todos os reagentes foram abertos e fechados dentro da câmara de fluxo laminar. A observação das células foi feita através de um microscópio invertido *Axiovert 135 (Zeiss, Alemanha)*.

8.1.2. Descongelação das células

O DMSO é um crioprotector que reduz o conteúdo aquoso das células prevenindo a formação de cristais de gelo, que poderiam levar à lise celular durante o processo de congelação.

A descongelação das células deve ser um processo realizado rapidamente de forma a evitar que ocorram danos na membrana celular.

Tabela A.I – Volumes dos reagentes usados na cultura de células e nos ensaios de acordo com o tamanho do frasco/placa.

| Reagentes | Frascos | Placas | | |
|--|-----------|---------------|---------------|--------------|
| | T-75 (mL) | 96 poços (μL) | 12 poços (μL) | 6 poços (μL) |
| PBS | 7 | - | 500 | 1000 |
| Tripsina-EDTA | 1,5 | - | 150 | 300 |
| Meio de cultura suplementado com 10% FBS para neutralizar a tripsina | 8,5 | - | 250 | 500 |
| Volume final | 15 | 100 | 1000 | 2000 |

8.1.3. Criopreservação das células

A solução de congelação era composta por FBS com DMSO 10% (v/v) (*Sigma-Aldrich*).

A congelação foi feita com a temperaturas de forma gradual, para evitar a morte celular.

8.1.4. Propagação e expansão das células

O PBS é uma solução salina utilizada na passagem das células com objetivo de manter as células em condições óptimas de pH no curto período em que as células são manipuladas. Para além desta solução permitir a remoção de células mortas e de resíduos de soro que poderiam inibir a tripsina, não contém catiões divalentes (como por exemplo, Ca^{2+} e Mg^{2+}) que actuam como inibidores da tripsina. Assim, a tripsina-EDTA causa a dissociação das ligações entre as células (aderentes) e das células à superfície do frasco. Para além disso, o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) presente na solução de tripsina, sendo um agente quelante, permite que ocorra inactivação dos restantes iões divalentes que possam estar presentes no meio, o que aumenta a eficácia de dissociação das células.

8.2. Compostos testados

Tabela A.II – Informações de massa, solubilidade e concentrações dos *stocks* de Palbociclib e Tipifarnib.

| | Palbociclib | Tipifarnib |
|---|-------------|------------|
| Massa do produto (mg) | 10 | 10 |
| Massa molecular (g/mol) | 483,99 | 489,4 |
| Solubilidade a 25°C em água (mM) | 61,98 | 2,04 |
| Solubilidade a 25°C em DMSO (mM) | 6,2 | 28,6 |
| Concentração da solução stock (mM) | 6 | 20 |
| Volume da solução stock (mL) | 3,444 | 1,022 |

8.3. Ensaio de viabilidade metabólica celular

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|---|---|----------|----------|--------|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | Controlo | | | 10 μ M Tip | 10 μ M Tip | 10 μ M Tip | | | | Controlo | |
| C | | 0.1 μ M Tip | 0.1 μ M Tip | 0.1 μ M Tip | | Controlo | | | | | | |
| D | | 0.5 μ M Tip | 0.5 μ M Tip | 0.5 μ M Tip | 15 μ M Tip | 15 μ M Tip | 15 μ M Tip | | | Controlo | | |
| E | | Controlo | | | 20 μ M Tip | 20 μ M Tip | 20 μ M Tip | | | | Controlo | |
| F | | 1 μ M Tip | 1 μ M Tip | 1 μ M Tip | | Controlo | | | | | | |
| G | | 5 μ M Tip | 5 μ M Tip | 5 μ M Tip | 25 μ M Tip | 25 μ M Tip | 25 μ M Tip | | | Controlo | | |
| H | | | | | | | | | | Branco | Branco | Branco |

Figura A.1 – Exemplo de esquema de distribuição de diferentes concentrações do composto e controlos em placas de 96 poços usadas nos ensaios de viabilidade, neste caso para o composto Tipifarnib (Tip). Os replicados foram colocados na horizontal, sequencialmente para uma melhor uniformidade entre réplicas. A concentração do composto/poço variou de 0,1 a 25 μ M.

8.4. Estudo do ciclo celular por citometria de fluxo

A citometria de fluxo utiliza princípios de dispersão da luz em partículas que são atravessadas por um feixe de luz. Os fluorocromos ligados a moléculas específicas nas células podem ser excitados e emitir fluorescências com frequências diferentes, permitindo identificar diferentes populações de células, que se encontrem em diferentes fases do ciclo celular ou em apoptose ou necrose (102).

A citometria de fluxo (*FACS – Fluorescence-Activated Cell Sorting*) pode ser utilizada para avaliar a proliferação celular através da quantificação da proporção de células nas diferentes fases do ciclo celular para uma determinada população de células.

O conteúdo de DNA numa célula em fase G₀/G₁ corresponde ao DNA de células diploides. Por outro lado, as células tanto em fase G₂ como em fase M (mitóticas) têm o dobro da quantidade de DNA que existe na fase G₁, não sendo possível distinguir entre a fase G₂ e a fase M pelo conteúdo em DNA (figura A.2) (103).

Na análise por citometria de fluxo, as células são permeabilizadas e marcadas com iodeto de propídio (PI). O PI é um agente intercalante (corante fluorescente), que se incorpora no DNA, permitindo quantificar o conteúdo de DNA numa população de células nas diferentes fases do ciclo celular. A intensidade de fluorescência das células coradas, com comprimentos de onda específicos, está relacionada com a quantidade de DNA. Assim, como a quantidade de DNA duplica durante a fase S do ciclo celular, a quantidade relativa de células em G₁/G₀ e G₂/M pode ser determinada, sendo que em G₂/M corresponderá ao dobro da quantidade de DNA em G₁/G₀ (104).

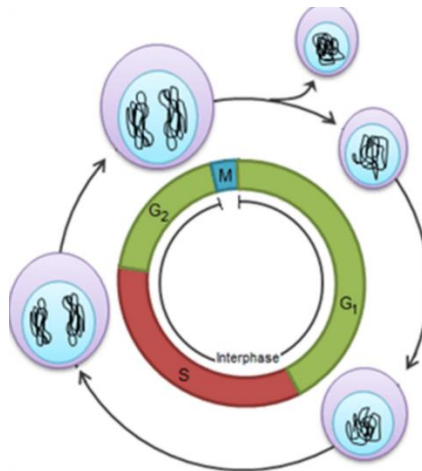


Figura A.2 – Variação da quantidade de DNA na célula ao longo do ciclo celular. [adaptado de (105)].

8.5. Estudo da morte celular por citometria de fluxo

A necrose é a morte permanente das células, causada maioritariamente por factores externos, tais como, toxinas, hipoxia ou lesões membranares (106). Por outro lado, a apoptose, designada também como morte celular programada, faz parte do processo fisiológico da célula resultando em várias alterações celulares: condensação do citoplasma, fragmentação da cromatina nuclear, perda de integridade e assimetria da membrana, resultando consequentemente na exposição da fosfatidilserina (PS) na camada externa da bicamada fosfolipídica da célula. Assim, a PS pode ser detectada pela anexina-V que se liga especificamente a PS na presença de cálcio (figura A.3) (107).

O PI é um agente intercalante que marca as células mortas por ligação aos ácidos nucleicos das células necróticas, sendo que as células vivas e pré-apoptóticas não são permeáveis a este marcador (108).

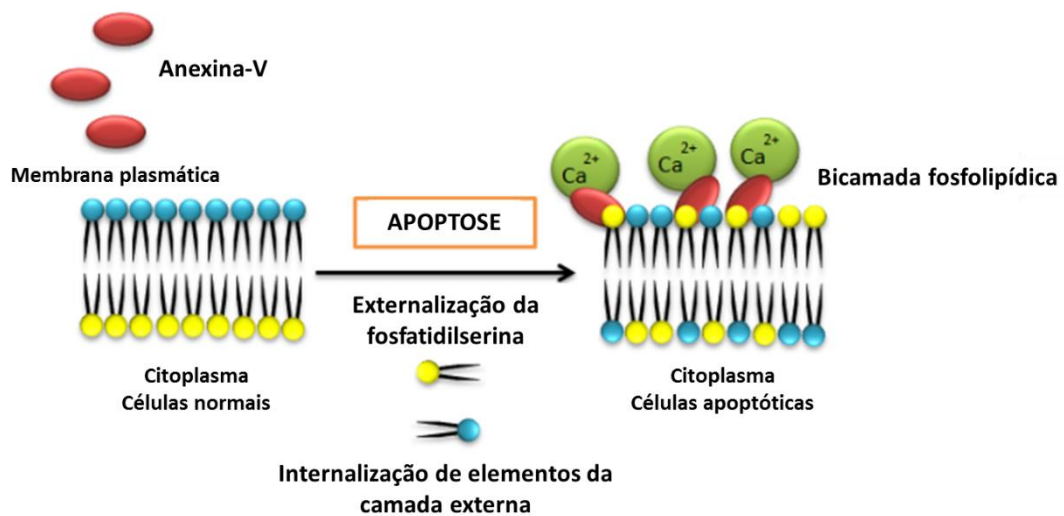


Figura A.3 – Representação esquemática da detecção de células apoptóticas por ligação da anexina-V à fosfatidilserina [adaptado de (22)].

8.6. Estudo da viabilidade celular por contagem directa em hemocitómetro

Quando ocorre morte celular, a membrana celular fica danificada e as células tornam-se permeáveis ao azul de tripano, permitindo a coloração dos núcleos. Assim, no hemocitómetro é possível contar o número de células viáveis (não coradas) e determinar a concentração celular (células por mL). Para a contagem é preparada uma diluição 1:2 das células recolhidas, adicionando a 20 µL de suspensão celular 20 µL de azul de tripano (*Biochrom AG*, Alemanha) (diluído 1:3 em PBS).

O cálculo da concentração celular é feito da seguinte forma (figura A.4):

$$\text{Concentração celular (cel/mL)} = \text{n}^{\circ} \text{ células viáveis contadas (média)} \times 2 \\ (\text{factor de diluição}) \times 10^4$$

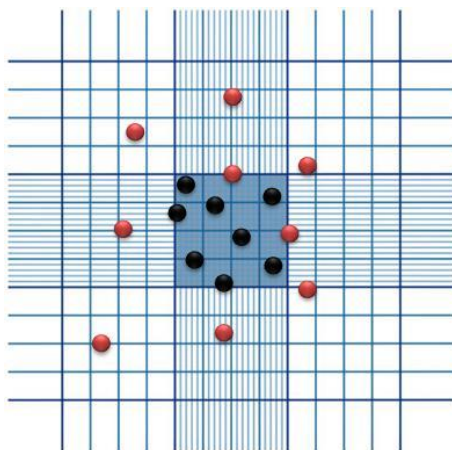


Figura A.4 – Representação de um hemocitómetro. A preto estão representadas as células que se contam e a vermelho as células que não se contam, por cada quadrante [adaptado de (22)].

8.7. Extracção de RNA

Tabela A.III – Tampões utilizados na extracção de RNA e respectiva função.

| Solução | Função |
|-----------------|--|
| Tampão RLT | Tampão com sais de guanidina e promove a lise celular e a ligação do RNA à membrana da coluna de sílica RNAeasy. |
| Etanol 70% | Precipitação do RNA total. |
| Tampão RW1 | Remoção de compostos biomoleculares que não tenham afinidade com a coluna. |
| Tampão RPE | Remoção de sais da coluna (provenientes dos tampões usados anteriormente). |
| Água RNase-free | Água utilizada para eluir o RNA da coluna porque previne a degradação do RNA obtido. |

8.8. Quantificação do RNA por espectrofotometria

O método de quantificação de ácidos nucleicos por espectrofotometria quantifica a radiação ultravioleta (UV) que é absorvida pelas purinas e pirimidinas que estão presentes nos ácidos nucleicos de uma amostra (74).

Tal como descrito na lei de Lambert-Beer, a absorvância de uma determinada amostra obtida num dado comprimento de onda específico e com uma espessura fixa é directamente proporcional à concentração dessa amostra (74):

$$A = \varepsilon \times b \times c$$

A – absorvância, ε – coeficiente de extinção molar ($M^{-1}cm^{-1}$), b – espessura da célula (cm), c – concentração da amostra (M).

Uma absorvância ou densidade óptica (DO) de 1 corresponde a uma concentração de 50 $\mu g/ml$ para o DNA em cadeia-dupla e a 40 $\mu g/ml$ para o DNA em cadeia simples ou para o RNA. Assim, pode determinar-se a concentração de ácidos nucleicos pela seguinte equação (74):

$$[RNA](ng/\mu L) = A_{260} \times 40 \times factor\ de\ diluição$$

8.9. Síntese de cDNA por transcrição reversa de RNA

Na síntese de cDNA são utilizados *random primers* que hibridam com os diferentes mRNAs que estejam presentes na amostra de forma aleatória. A transcriptase reversa é a enzima responsável pela extensão da cadeia de cDNA a partir desses *primers*, utilizando o RNA como molde para a síntese do cDNA.

A água bidestilada utilizada nas diluições do cDNA é tratada com DEPC de forma a inactivar possíveis enzimas RNases que estejam presentes na água.

8.10. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

A detecção de produtos de PCR em tempo real é possível pela inclusão de uma molécula fluorescente na reacção que reporta o aumento da quantidade de DNA com o aumento proporcional do sinal fluorescente. As moléculas fluorescentes usadas podem ser fluoróforos intercalantes do DNA ou cDNA, *SYBR Green I* (Applied Biosystems, EUA) ou sondas fluorescentes, como por exemplo, sondas *TaqMan*

(*Applied Biosystems*, EUA). São usados termocicladores específicos equipados com detectores de moléculas fluorescentes para monitorizar a fluorescência durante as reacções de amplificação (75).

O PCR em tempo real pode ser analisado por quantificação relativa (quantidade relativa de uma sequência específica de DNA ou cDNA presente numa amostra em comparação com um controlo) ou quantificação absoluta, indicando o número de cópias de DNA ou cDNA presentes numa amostra.

No início da reacção, os níveis de fluorescência permanecem baixos (entre 1 e 18 ciclos), apesar de haver acumulação exponencial dos produtos da reacção. No entanto, há um ciclo em que essa acumulação atinge níveis de fluorescência detectáveis que se designa *threshold cycle* (C_T), correspondendo ao ponto (número de ciclos) onde se atinge o limiar da fase exponencial. O valor de C_T é inversamente proporcional à quantidade de gene alvo presente numa amostra, sendo assim possível comparar a expressão desse gene entre amostras pela comparação dos C_{Ts} . Durante a fase exponencial do PCR, o sinal de fluorescência duplica em cada ciclo (75).

Um PCR quantitativo em tempo real é baseado na relação entre a quantidade de DNA presente inicialmente na amostra e o valor de C_T obtido durante a amplificação, sendo necessário garantir a eficiência da reacção e a reproductibilidade entre réplicas reaccionais. Para isso, procedeu-se ao desenho de uma curva-padrão através de diluições seriadas feitas a partir de uma amostra com concentração conhecida de DNA. Identificou-se uma regressão linear entre o C_T e o logaritmo da quantidade inicial de ácido nucleico alvo numa amostra padrão. A partir desta regressão linear obtivemos R^2 que nos permite avaliar a linearidade dos resultados, assim como, calcular a eficiência da reacção de amplificação pela fórmula (75):

$$E = 10^{-1/\text{declive}}$$

A eficiência da reacção deve ser próxima de 2 (~100 %), visto que em cada ciclo há um aumento de duas vezes do número de cópias do DNA *template*.

A curva padrão é também definida para um controlo endógeno (gene constitutivo – *housekeeping*), definido como sendo uma sequência de ácido nucleico que esteja presente em todas as amostras em estudo, em quantidades mais ou menos constantes e que não seja afectado pelas condições da experiência (75).

As curvas de *melting* podem ser usadas para identificar diferentes produtos de reacção, incluindo produtos não específicos. São complementares às reacções de amplificação e são geradas por pequenos aumentos de temperatura e monitorizam o sinal de fluorescência em cada etapa; quando há desnaturação do DNA em cadeia-dupla, há diminuição da fluorescência. Estas curvas apresentam uma relação entre a quantidade de fluorescência e a temperatura da reacção. T_m (temperatura de *melting*) é atingida quando 50 % dos pares de bases do DNA em cadeia-dupla são separados (75).

9. Anexo II

Soluções que foram preparadas para a realização do trabalho experimental:

Tabela A.IV – Preparação da solução de PI (50 µg/mL).

| Solução PI (50 µg/mL) |
|---|
| 50 µL/mL PI (500 µg/mL, <i>Sigma</i> , <i>EUA</i>) |
| 0,1 mg/mL RNase (<i>Citomed</i> , Portugal) |
| 0,05 % (v/v) Triton X-100 (<i>Sigma</i> , <i>EUA</i>) |
| PBS 1X (-Mg ²⁺ /Ca ²⁺) (<i>GIBCO</i> TM , <i>EUA</i>) |

Tabela A.V – Preparação da solução de PBS-BSA 0,2 % (p/v).

| PBS 1X-BSA 0,2 % (p/v) |
|---|
| 0,2 % (p/v) BSA (≥99 %, <i>Sigma</i> , <i>EUA</i>) |
| + |
| PBS 1X (-Mg ²⁺ /Ca ²⁺) (<i>GIBCO</i> TM , <i>EUA</i>) |

Tabela A.VI – Preparação do tampão de anexina-V.

| Tampão de Anexina-V (1X) |
|--|
| 0,01 M HEPES, pH 7,4 (≥99 %, <i>Millipore</i> , Alemanha) |
| 0,14 M NaCl (≥99,5 %, <i>Merck</i> , Alemanha) |
| 2,5 mM CaCl ₂ (≥99,9 %, <i>Sigma</i> , <i>EUA</i>) |

10. Referências bibliográficas suplementares

102. Maftah A, Huet O, Gallet P-F, Ratinaud M-H. Flow cytometry's contribution to the measurement of cell functions Biol Cell. 1993;78:85-93.
103. Nunez R. DNA Measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. Molecular Biology. 2001;3:67-70.
104. Cecchini MJ, Amiri M, Dick FA. Analysis of cell cycle position in mammalian cells. Journal of visualized experiments : JoVE. 2012(59).
105. Edu-Resource. Eukaryotic cell cycle, Accessed: September 2016.
106. Dive C, Grego CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. Biochimica et Biophysica Acta. 1992;1133:275-85.
107. Engeland Mv, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. Cytometry. 1993;31:1-9.
108. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. Journal of visualized experiments : JoVE. 2011(50).